Aus der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik Würzburg

Direktor: Professor Dr.med E. Kern

BEEINFLUSSUNG DER LEBERFUNKTION DURCH KONTINUIERLICHE UND AKUTE BELASTUNG MIT ESCHERICHIA COLI ENDOTOXIN AN DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN RATTENLEBER

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Ortwin Pröbstl

aus Schongau

Würzburg, den 11. Mai 1981

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik Würzburg

Direktor: Professor Dr.med E. Kern

BEEINFLUSSUNG DER LEBERFUNKTION DURCH KONTINUIERLICHE UND AKUTE BELASTUNG MIT ESCHERICHIA COLI ENDOTOXIN AN DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN RATTENLEBER

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Ortwin Pröbstl

aus Schongau

Würzburg, den 11. Mai 1981

Referent: Prof. Dr. Hockerts

Korreferent: Prof. Dr. Kern

Dekan: Prof. Dr. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 30.7.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1 Septischer Schock beim Menschen	1
1.2 Menschliche Leber bei Endotoxinämie	1
2. PROBLEMENTWICKLUNG	3
3. MATERIAL UND METHODIK	5
3.1 Ratten, Endotoxin, Perfusionsmedium	5
3.2 Methode der isolierten Perfusion der Leber	5
3.2.1 Prinzip der Methode	6
3.2.2 Standardbedingungen	6
3.2.3 Versuchsaufbau	7
3.2.4 Leberpräparation	9
3.2.5 Zugabe von Endotoxin	11
3.3 Analytik	12
3.3.1 Entnahmen und direkte Messungen	12
3.3.2 Gaschecks	13
3.3.3 Enzymdiagnostik	13
3.4 Statistik	15
4. ERGEBNISSE	17
4.1 Nullversuche	17
4.2 Kontinuierliche Endotoxinbelastung	18
4.2.1 Leberfluß	18
4.2.2 Gallefluß	21
4.2.3 Gaswerte	23
4.2.4 Enzymaktivitäten	25
4.3 Akute Endotoxinbelastung	31
5. DISKUSSION	36
5.1 Kontinuierliche Endotoxingabe	36
5.1.1 Verminderung des Leberflusses	36
5.1.2 Cholestatische Wirkungen	38
5.1.3 Veränderung der O_2-Differenz	40
5.1.4 Veränderung der Enzymaktivitäten	42
5.2 Akute Gabe von Endotoxin	45
6. ZUSAMMENFASSUNG	47
LITERATURVERZEICHNIS	49

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543527_0065

1. EINLEITUNG

1.1 Septischer Schock beim Menschen

Der septische Schock beim Menschen ist gekennzeichnet durch eine Kreislaufinsuffizienz, die durch zirkulierendes Endotoxin hervorgerufen wird. Als Endotoxin werden Lipopolysaccharide in der Zellwand von Bakterien bezeichnet. Diese Endotoxine wirken als gefäßaktive Substanzen und führen zu einem venösen Pooling. Der verminderte venöse Rückstrom verursacht einen Abfall im Herzminutenvolumen. Gestörte Gewebedurchblutung und - unter Umständen - der Tod des Schockpatienten sind das Endresultat (HARKEN et al. 1975).

Ätiologisch kommen sowohl gramnegative als auch grampositive Keime in Betracht (Mc LEAN et al. 1967). Bei den gramnegativen Keimen findet man als Ursache des septischen Schockgeschehens besonders häufig Colibakterien, Pseudomonas, Proteus, Aerobacter aerogenes, Klebsiellen und Salmonellen (VERAGUT et al. 1976); also mit Ausnahme von Pseudomonas vorwiegend Keime der physiologischen Darmflora des Menschen. Berichtet wird auch von septischen Schockzuständen mit grampositiven Pneumokokken und Streptokokken (VERAGUT et al. 1976).

Betroffen sind vor allem Patienten mit Krankheiten, die eine Invasion von Keimen in die Blutbahn prädisponieren (PETERSDORF 1977). Etwa 20 % der Patienten mit einer gramnegativen Bakteriämie entwickeln das klinische Bild des Endotoxin-Schocks. Die Mortalität dieser Patienten wird mit 80 % angegeben (WEIL et al. 1964).

1.2 Menschliche Leber bei Endotoxinämie

Die Pathologie der Leber bei Endotoxinämie und im septischen Schockgeschehen wird vor allem unter zwei Gesichtspunkten betrachtet:

1. Bei Patienten mit gramnegativer Bakteriämie verändern sich verschiedene Werte der Leberfunktionsproben; bei Säuglingen kommt es sogar zum Ikterus.
2. In jüngsten Publikationen werden Endotoxinämien als mitbestimmend für die Pathogenese einiger Leberkrankheiten diskutiert.

Ein intrahepatischer cholestatischer Ikterus als Folge einer Sepsis kommt vor allem bei Säuglingen und Kleinkindern vor (z.B. ROONEY et al. 1971). Die Ursache der Sepsis ist dabei meist eine Bakteriämie (z.B. SEELER et al. 1969). Auch bei Erwachsenen kommt es bei Bakteriämie zu einem vorübergehenden leichten Anstieg des Bilirubins (MILLER et al. 1969).

Aus dem Darm absorbierte Keime, die normalerweise vom RES der Leber geklärt werden, sollen bei vorgeschädigtem RES ungenügend phagozytiert werden und eine periportale Entzündung hervorrufen (BJØRNEBOE et al. 1975). Diese ursprünglich als Hypothese formulierte Erklärung des Zustandekommens von gewissen Leberkrankheiten wurde durch die klinische Beobachtung des Koinzidenz zwischen Endotoxinämie und einzelner Symptome einer fulminanten Hepatitis (WILKINSON et al. 1974), bzw. einer Leberzirrhose (LIEHR et al. 1976) erhärtet.

2. PROBLEMENTWICKLUNG

Klinische Untersuchungen haben gezeigt, daß sich bei Bakteriämie und im septischen Schock an der Leber ein komplexeres Geschehen abspielt, als dies beim allgemeinen Schockgeschehen - zum Beispiel aufgrund der Zentralisation des Kreislaufs - der Fall ist (z.B. LIEHR et al. 1975; Mc KAY et al. 1967). Deshalb sollen die direkten Wirkungen, die Endotoxine auf das Lebergewebe ausüben, untersucht werden. Alle indirekten Einflüsse, die aus dem Schockablauf resultieren, sollen eliminiert werden.

Mit der isoliert perfundierten Rattenleber steht uns für diese Untersuchung eine ideale Methode zur Verfügung: Hier erlaubt ein vom Körperkreislauf unabhängiges System eine Konzentration auf das zu untersuchende Organ. Diese Verfahrensweise bietet die Vorteile der Untersuchung am lebenden Organ. Die Nachteile von reinen in vivo Versuchen, wo die Kontrolle von humoralen, nervalen und anderen Einflüssen oft nicht möglich ist, entfallen. Auch erlaubt uns diese Methode, von den Einflüssen des "Organes" Blut, insbesondere von möglichen Veränderungen der Erythrozytenfunktion durch Endotoxin, unabhängig zu sein: Wir verwenden deshalb ein künstliches Perfusionsmedium.

Im Gegensatz zu allen uns bekannten Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenleber benutzen wir kein rezirkulierendes System, bei dem das Perfusionsmedium nach Leberpassage in den Vorratsbehälter zurückfließt und von neuem der Leber angeboten wird. Unsere Versuchsanordnung ermöglicht die einmalige Perfusion, wobei die Leber immer mit frischem Medium durchflutet wird. Das bringt folgende Vorteile mit sich:

- Eine konzentrationskonstante Gabe von Endotoxin an die Leber ist gewährleistet. Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Endotoxin (BRAUDE et al. 1955) haben nämlich gezeigt, daß nach Injektion letaler Endotoxinmengen in Kaninchen schon nach 15 Minuten 65 % Clearance erreicht war. Bei einmaliger Perfusion mit konzentrationskonstanter Endotoxingabe kommen wir der klinischen Realität näher: Hierbei gelangen - z.B. bei einer Peritonitis - laufend Keime in die Blutbahn; die Leber wird dadurch einer län-

ger anhaltenden Endotoxinämie ausgesetzt.

- Diese Versuchsanordnung ermöglicht weiterhin die akute (hochdosierte) Belastung der Leber mit Endotoxin.

Im einzelnen sollen folgende Fragen untersucht werden:

1. Gibt es bei Endotoxinämie eine Beeinträchtigung des Leberflusses, die von außerhalb der Leber gelegenen Einflüssen unabhängig ist?
2. Ist der Ikterus, der bei manchen Patienten mit Sepsis beobachtet wird (z.B. SEELER et al. 1969) auf eine Wirkung des Endotoxins am Gallefluß zurückzuführen?
3. Sind Enzymanstiege bei Endotoxinämie (wie sie bei Tierversuchen in vivo gemessen werden, z. B. KONTTINEN et al. 1964) auf eine spezifische Enzymfreisetzung der Leber zurückzuführen, und lassen sich gegebenenfalls aus dem Enzymmuster Rückschlüsse auf Art und Ausmaß der Organschädigung ziehen?
4. Bei Patienten im septischen Schock läßt sich eine verminderte arteriovenöse Sauerstoffdifferenz feststellen (COHN et al. 1968). Können am isolierten Organ solche Ergebnisse gefunden werden; sind sie also von der Erythrozytenfunktion unabhängig?
5. a) Entstehen schon bei kurzfristiger massiver Belastung der Leber mit Endotoxin am Organ Schäden, oder ist eine längerfristige Endotoxineinwirkung notwendig, um die Funktion der Leber zu beeinträchtigen?
   b) Wie stellt sich gegebenenfalls die Schädigung bei akuter Belastung der Leber im Vergleich zu Schäden bei kontinuierlicher Endotoxingabe dar?

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1 Ratten, Endotoxin, Perfusionsmedium

In unseren Versuchen verwenden wir weibliche R a t t e n vom Typ Wistar. Sie werden vor dem Versuch gewogen. Ihr Gewicht liegt zwischen 250 und 350 g. Vor ihrer Verwendung werden sie normal mit Wasser und üblicher Nahrung ernährt.

E n d o t o x i n wird vor jedem Versuch frisch zubereitet aus der bei 4 °C gelagerten Trockensubstanz von Escherichia coli Lipopolysacchariden (0127 : B8) der Difco Laboratories, Washington. 100 g werden in 5 ml steriler, pyrogenfreier NaCl-Lösung aufgelöst.

Unser erythrozytenfreies P e r f u s i o n s m e d i u m besteht aus einer Krebs-Henseleit-Lösung (THER 1965), Albumin und einem Plasmaexpander (Haemaccel ^{R} = über Harnstoffbrücken vernetzte Polypeptide, Aqua, Elektrolyte etc.).
Die genaue Zusammensetzung ist:

1000 ml Haemaccel ^{R}
1000 ml NaCl
40 ml KCl
30 ml $CaCl_2$
20 ml KH_2PO_4
20 ml $MgSO_4$
420 ml $NaHCO_3$
100 ml Glucose
15 g Serumalbumin vom Rind.

Vor der Mischung wird das $NaHCO_3$ eine halbe Stunde, nach Mischung das gesamte Perfusat ebenso lange mit Carbogen (95 % O_2, 5 % CO_2) durchperlt, um den nötigen pH-Wert (7,4) zu erreichen. Außerdem wird das Perfusat auf 37,5 °C vorgewärmt und gelangt mit dieser Temperatur zur Verwendung.

3.2 Methode der isolierten Perfusion der Leber

Die Methode der Leberperfusion begründet sich auf MILLER et al. (1951) und ist eine bedeutende, standardisierte Untersuchungsme-

thode mit breiter Anwendungsmöglichkeit. Die isoliert durchströmte Rattenleber stellt ein Bindeglied zwischen reinen in vitro und in vivo Versuchen dar. Sie eignet sich besonders zur Klärung physiologischer, pathophysiologischer, biochemischer, pharmakologischer und toxikologischer Fragen.
Vorteile dieser Methode sind unter anderem:

- ständige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unter Wahrung der Standartbedingungen
- Unabhängigkeit von Einflußgrößen am Ganztier: humorale und nervale Regulation von Zentren, die außerhalb der Leber liegen
- Elimination der Nierenexkretion; damit Möglichkeit, die Substanzenkonzentration konstant zu halten
- Möglichkeit, den Lebermetabolismus vom Gesamtmetabolismus abzugrenzen.

3.2.1 Prinzip der Methode

Die Leber der ausgewachsenen Ratte wird von den natürlichen Kreisläufen abgeschaltet, isoliert und unter konstantem Druck von einem Perfusionsmedium bei gleichbleibender Temperatur von 37 ^{o} C durchströmt. Eine künstliche Lunge sorgt für die Lösung von Sauerstoff im Perfusat, der als Carbogen (95 % O_2, 5 % CO_2) angeboten wird. Eine Rollenpumpe sorgt für einen konstanten Fluß der Perfusionsflüssigkeit. Entnahmen von Perfusatproben ermöglichen die Bestimmung von Funktion und Funktionsänderung des isolierten Organs. Außerdem ist die ständige Kontrolle und quantitative Messung des Leber- und Galleflusses möglich.

3.2.2 Standardbedingungen

Nach SCHIMASEK (1963) ist ein befriedigender "funktioneller" Status der isoliert perfundierten Rattenleber erreicht, wenn

1. ständig das gleiche Perfusionsmedium die Leber durchströmt
2. der Leberperfusatdurchfluß mit mehr als 1,0 ml/min/g Lebergewicht das physiologische Flußvolumen nicht unterschreitet
3. der Gallefluß gewährleistet ist und mindestens 0,05 ml/15 min beträgt

4. die Lebertemperatur 37 ^{o} beträgt

5. der Leber eine angemessene Zeit zur Adaptation zugestanden wird, währenddessen keine Zugabe der Untersuchungssubstanz erfolgt.

Diese Versuchsbedingungen ("Standardbedingungen") werden bei unseren Versuchen kontrolliert und sind Voraussetzung für die Wertung unserer Ergebnisse.

Unter diesen Bedingungen ist der Zustand der isoliert perfundierten Rattenleber mit dem physiologischen Zustand des Organs im Gesamtorganismus vergleichbar.

3.2.3. Versuchsaufbau

Für unsere Versuche steht uns eine Leberperfusions-Apparatur der W. Krannich KG, Göttingen zur Verfügung, deren Prinzip den Angaben von MILLER et al. entspricht (siehe Abb. 1).

Das Perfusionsmedium befindet sich zum größten Teil im Vorratsbehälter (1) am Boden der Apparatur. Von einem Magnetrührer (2), der sich unter der Bodenplatte befindet, wird es in dauernder Bewegung gehalten. Eine Rollenschlauchpumpe (3) unter der Bodenplatte befördert das Perfusionsmedium über einen Schlauch in die künstliche gläserne Lunge (4). Aus der Lunge gelangt das Perfusat über einen in der Pfortader eingebundenen Katheter (6) in die Leber. Das überschüssige durch die Lunge beförderte Blut fließt über einen Überlauf (7) in den Vorratsbehälter zurück. Die Ratte mit der isolierten Leber befindet sich auf einer in der Höhe verstellbaren Korkplatte. Durch das Verstellen der Höhe läßt sich ein bestimmter konstanter Perfusionsdruck im Pfortaderkatheter einstellen. Er ist aus dem Abstand zwischen dem Flüssigkeitsspiegel in der Glaslunge und der Höhe der Leber bzw. der Pfortader abzulesen (Angabe in cm H_2O). Der Perfusionsdruck beträgt bei allen Versuchen konstant 13 cm H_2O, was dem physiologischen Druck in der Pfortader der lebenden Ratte gleichkommt und für eine ausreichende Perfusion des Lebergewebes (1,0 ml/min/g Lebergewicht) sorgt.

Das aus der Leber ausfließende Blut gelangt über einen Katheter

in der Vena cava inferior (8) der Ratte in ein graduiertes Glasgefäß (9). Dort wird der Leberdurchfluß quantitativ bestimmt. Dem Glasgefäß nachgeschaltet ist ein Dreiweghahn (10): Blut kann so entweder posthepatisch zur Enzym- und Gasbestimmung gewonnen, oder das Perfusat in einem Schlauch zum Ausguß (11) befördert werden.

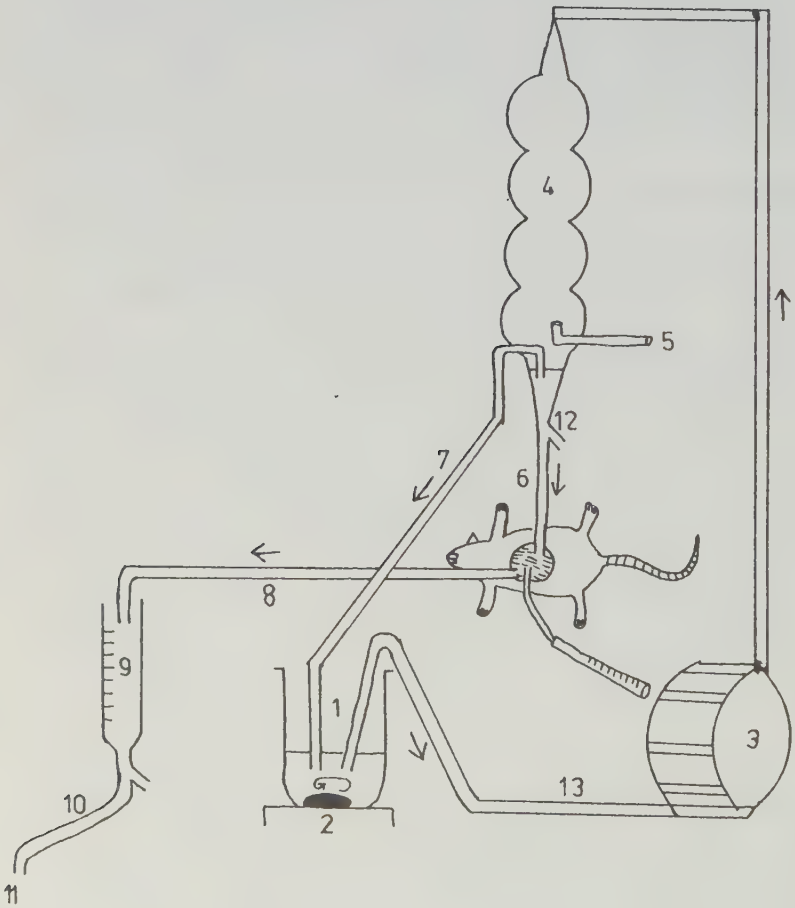


Abb. 1: Perfusionsapparatur

Die Stelle der prähepatischen Perfusatentnahme für die arterielle Gasbestimmung befindet sich zwischen der Lunge und dem Anschluß des Pfortaderkatheters (12).

Das zur Gasarterialisierung notwendige Gasgemisch wird über ein Waschflaschensystem in die untere Hälfte der Glaslunge eingeleitet (5).

Die Thermokonstanz in der Apparatur wird durch einen Heizlüfter gewährleistet.

Das ganze System befindet sich in einem abgeschlossenen Plexiglasgehäuse mit einer Schiebetür an der Vorderseite.

3.2.4 Leberpräparation

Die Ratte wird mit Äther narkotisiert. Anschließend wird ihr intraperitoneal 5 ml Urethan (25 %ig), sowie 1 ml Heparin (4 %o) injiziert. Das Versuchstier wacht aus seiner Äthernarkose auf; anschließend - nach etwa 5 Minuten - beginnt die narkotisierende Wirkung des resorbierten Urethans.

Die Präparation wird in Anlehnung an HEMS et al. (1966) und MILLER (1973) durchgeführt (siehe Abb. 2 und 3).

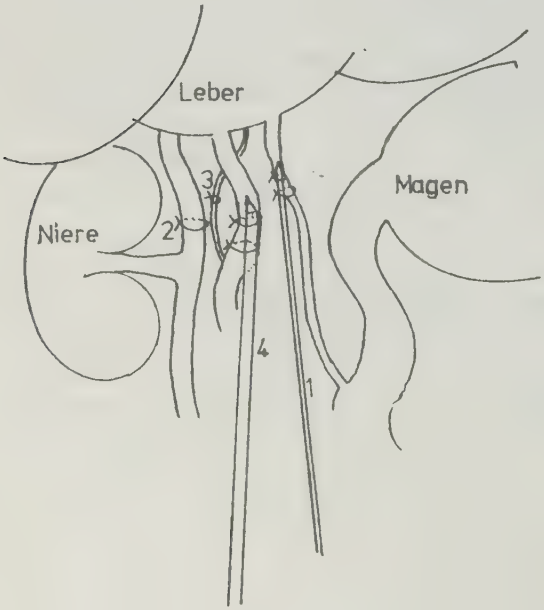
Am Fell wird ein Medianschnitt von der Symphyse bis zum Hals angelegt, das Fell nach beiden Seiten bis zu den Flanken freipräpariert. Daraufhin wird das Peritoneum mit einem Medianschnitt von der Symphyse bis zum Sternum eröffnet und die Bauchhöhle dargestellt. Nach Darstellung des Gallengangs wird in diesen ein Katheter (Länge 8 cm, Durchmesser 0,5 mm) eingebunden. An der Arteria hepatica und an der Vena cava inferior oberhalb der Einmündung der Nierenvenen werden Ligaturen vorbereitet; die Unterbindung der Gefäße wird erst später vorgenommen. Jetzt wird in die Pfortader ein Katheter (Länge 22 cm, Durchmesser 1 mm) eingebracht und mit zwei Ligaturen fixiert. Schnellstmöglich werden die nun folgenden Präparationen bei geöffnetem Brustkorb durchgeführt:

Die vordere Brustwand wird entfernt und das Herz freigelegt. Ein Katheter (17,5 cm lang, Durchmesser 1 mm) wird vom rechten Herzohr durch den rechten Vorhof in die Vena cava inferior vorgeschoben und fixiert. Jetzt kann das Präparat an den künstlichen Kreislauf angeschlossen werden. Nach Anschluß werden die vorbereiteten Ligaturen an der Leberarterie und an der unteren Hohlvene geschlossen.

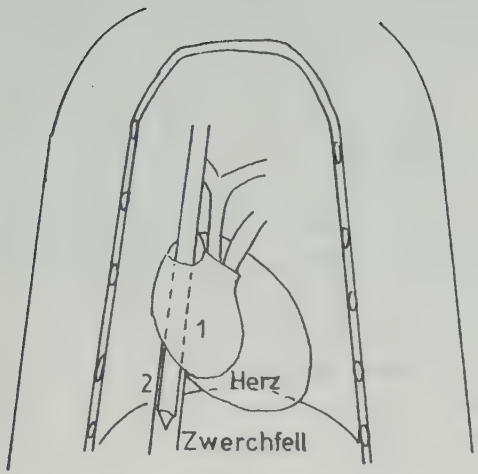
Die Phase von der Eröffnung des Brustkorbes bis zum Anschluß an den Kreislauf überschreitet bei uns nie 5 Minuten (= Ischämiephase der Leber, da die Lungenatmung der Ratte entfällt). Die gesamte Präparation nimmt weniger als 15 Minuten in Anspruch.

Während der gesamten Arbeit wird ein Berühren der Leber, soweit möglich, vermieden. Im Gegensatz zur üblichen Technik belassen wir die Leber in situ, um

- die physiologische Lage des Organs zu garantieren
- die Ischämiephase so kurz wie möglich zu halten
- Berühren und andere traumatische Einwirkungen, soweit möglich zu vermeiden.



1 = Gallekatheter
2 = Ligatur an der unteren Hohlvene
3 = Ligatur an der Arteria hepatica
4 = Pfortaderkatheter



1 = rechter Vorhof
2 = Katheter in der unteren Hohlvene

Abb. 2 und 3: Schematische Darstellung der Leberpräparation

3.2.5 Zugabe von Endotoxin

Die Zugabe von Endotoxin erfolgt nach 30 Minuten Adaptationszeit, also zum Zeitpunkt 0, allerdings nachdem sämtliche Entnahmen und Messungen zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen sind.

Konstante Gabe

Hierzu wird das Vorratsgefäß (1) ausgetauscht und der Leber ein Perfusat mit der entsprechenden Konzentration an E.coli Endotoxin angeboten, das aber davon abgesehen die gleiche Zusammensetzung hat wie das Medium, das während der Adaptationszeit die Leber durchströmt.

Akute Gabe

Bei diesen Versuchen wird die angegebene Menge Endotoxin in 10 ml Perfusat gelöst und zwischen Vorratsbehälter und Lunge (13) in den zur Lunge führenden Schlauch gespritzt. Nimmt man eine mittlere Perfusion von 20 ml/min an und addiert die 10 ml hochkonzentrierte Endotoxin-Perfusatmischung zu dem Perfusat, das zwischen Einspritzstelle und Pfortaderkatheter fließt (ca. 50 ml in 3 Mi-

nuten), so ergibt sich eine ungefähre Einwirkdauer des Endotoxins von 3 - 4 Minuten.

3.3 Analytik

3.3.1 Entnahmen und direkte Messungen

Sämtliche Entnahmen und direkte Messungen erfolgen zu den Zeitpunkten 0 (nach 30 Minuten Adaptationszeit), 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75 und 90 Minuten.

Auf ein Umrechnen der Werte auf g Lebertrockengewicht, wie es in der Literatur teilweise angegeben ist (z.B. UTILI et al. 1976), wird in unserem Fall verzichtet.

Das Leberfeuchtgewicht wird nach jedem Versuch bestimmt und liegt immer zwischen 7,9 g und 9,4 g.

Direkte Messungen

Um den Leberfluß (ml/min) zu bestimmen, wird das Perfusat eine Minute lang posthepatisch in einem geeichten Meßzylinder (9) aufgefangen und das Volumen abgelesen. Für die Beurteilung der Ergebnisse wird der Wert bei 0 Minuten gleich 100 % gesetzt und die Prozentzahl zu den anderen Zeitpunkten aus dem gemessenen Wert in ml/min errechnet.

Zur Messung des Galleflusses (ml/15 min) wird an den Gallekatheter eine 2 ml-Meßpipette angeschlossen. Aus dem Stand der Gallesäule wird der Gallefluß alle 15 Minuten errechnet. Auch hier werden alle Werte in Beziehung zum Gallefluß bei 0 Minuten gesetzt und in Prozent ausgedrückt.

Entnahme der Proben zur Analyse der Gaswerte und der Enzymaktivitätsbestimmung

Zur Gasbestimmung werden etwa 2 ml des Perfusionsmediums vor der Leberpassage (12) sowie nach der Leberpassage (10) entnommen. Es wird darauf geachtet, daß dies "luftbläschenfrei", d.h. ohne Beimengung von Umgebungsluft, geschieht. Die Proben werden in 2 ml-Spritzen bis zur Analyse in Eis gelagert.

Für die Bestimmung der Enzymaktivität werden posthepatisch (10) jeweils 10 ml entnommen. Deren Analyse erfolgt gleich nach der Entnahme, um große Fehler aufgrund der Aktivitätsabnahme zu vermeiden.

3.3.2 Gaschecks

Bei allen Versuchen wird prähepatisch und posthepatisch der Sauerstoffgehalt in der Perfusionsflüssigkeit, sowie derden pH bestimmt. Uns steht hierfür ein Gerät - Gascheck-AVL 938 - zur Verfügung, das mit Membranelektroden arbeitet.

Sauerstoffmessung

Das Prinzip, das der Gasmessung dieses Gerätes zugrunde liegt, beruht darauf, daß Sauerstoff gemäß der Gleichung

$$H_2O + 1/2\ O_2 + 2\ e^- \rightleftharpoons 2\ OH^-$$

an einer Silberelektrode (Ag-Ag) reduziert wird. Durch den Elektronenfluß entsteht eine Änderung des Potentials (das durch ein Referenzgas auf einem genormten Wert gehalten ist), welches zur Sauerstoffkonzentration proportional ist.

pH-Messung

Die Messung des pH-Wertes geschieht in diesem Gerät mit Hilfe einer Glaselektrode. Durch Diffusion der H^+-Ionen durch die Glasmembran entsteht eine Potentialdifferenz zu einer Referenzelektrode, die dem pH-Wert proportional ist.

Das Gerät errechnet die Werte der Sauerstoffkonzentration und des pHs und druckt die Ergebnisse aus.

3.3.3 Enzymdiagnostik

(Literatur, Reagentien und Durchführung nach BOEHRINGER - MANNHEIM 1976)

G O T

Die Bestimmung der Aktivität der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase in unserem Perfusionsmedium erfolgt nach folgendem Prinzip:

Das Enzym GOT katalysiert die Gleichgewichtsreaktion
L-Glutamat + Oxalacetat $\rightleftharpoons$ L-Aspartat + α-Ketoglutarat.

Gemessen wird die Geschwindigkeit der Oxalacetat-Zunahme. Diese wird in der durch die Malat-Dehydrogenase katalysierten Indikatorreaktion bestimmt:
Oxalacetat + NADH + H^+ $\rightleftharpoons$ L-Malat + NAD^+.

NADH wird aufgrund seiner Absorbtion bei 340 nm gemessen.

G P T

Die Aktivität der Glutamat-Pyruvat-Transaminase wird bestimmt aus der Geschwindigkeit der Pyruvat-Zunahme in der Reaktion
L-Glutamat + Pyruvat $\rightleftharpoons$ L-Alanin + α-Ketoglutarat.

Die Geschwindigkeit der Pyruvatzunahme wird anschließend in der Indikatorreaktion
Pyruvat + NADH + H^+ $\rightleftharpoons$ L-Lactat + NAD^+
bestimmt, die durch die Lactat-Dehydrogenase katalysiert wird. NADH als Meßgröße wird bei 340 nm bestimmt.

L D H

Die Grundlage der Bestimmung der Aktivität der Lactat-Dehydrogenase ist die Reaktion
Pyruvat + NADH + H^+ $\rightleftharpoons$ Lactat + NAD^+,
die von LDH katalysiert wird. Gemessen wird auch hier NADH aufgrund seiner Absorption bei 340 nm.

G A M M A - G T

Die Gamma-Glutamyl-Transferase überträgt den Glutamyl-Rest von Glutamyl-p-nitroanilid auf Glycylglycin. Dabei wird p-Nitroanilin freigesetzt, das proportional zur Gamma-GT-Aktivität ist. Die aufgrund seiner Farbe verursachte Extinktionszunahme wird bei 405 nm gemessen.

C H E

Die Bestimmung der Aktivität der Cholinesterase erfolgt nach folgendem Prinzip:

Die CHE katalysiert folgende Reaktion:
Acetylthiocholin $\rightleftharpoons$ Acetat + Thiocholin
Gemessen wird die Geschwindigkeit der Konzentrationszunahme des Thiocholins. Dazu dient die Indikatorreaktion:
Thiocholin + Dithiobisnitrobenzoat $\rightleftharpoons$ 2-Nitro-5-mercapto-benzoat.

Die Farbintensität von 2-Nitro-5-mercapto-benzoat wird bei 440 nm gemessen.

3.4 Statistik

Alle Ergebnisse unserer Versuche werden als Mittelwerte m $\pm$ Standardabweichung s angegeben.

Um die Mittelwerte zu vergleichen, wird der t-Test in der Näherungsmethode nach WELCH (PFANZAGL 1974, S. 216 f.) benutzt. Stets wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($p < 0.05$) zugrundegelegt.

Verglichen werden die Versuchsergebnisse mit Endotoxingabe jeweils mit den Resultaten der Versuche ohne Endotoxingabe (Nullversuche).

Bei Leberfluß, Gallefluß und ΔpO_2 interessiert uns die signifikante Abnahme; also testen wir die Nullhypothese

H_0: Der Mittelwert der Meßwerte des Merkmals x, erhalten zum Zeitpunkt t bei k mg % Endotoxingabe, ist nicht kleiner als der Mittelwert des gleichen Merkmals, erhalten zum Zeitpunkt t ohne Endotoxingabe

gegen die Alternative

H_1: Der Mittelwert der Meßwerte des Merkmals x, erhalten zum Zeitpunkt t bei k mg % Endotoxingabe, ist kleiner als der Mittelwert des gleichen Merkmals, erhalten zum Zeitpunkt t ohne Endotoxingabe.

Bei den Enzymaktivitäten von GOT, GPT und LDH interessiert uns die signifikante Zunahme gegenüber den Ergebnissen der Nullversuche. Dementsprechend wird die Nullhypothese

H_0: Der Mittelwert der Meßwerte des Merkmals x, erhalten zum Zeitpunkt t bei k mg % Endotoxinbelastung, ist nicht größer als der Mittelwert des gleichen Merkmals, erhalten zum Zeitpunkt t ohne Endotoxingabe

gegen die Alternative

H_1: Der Mittelwert der Meßwerte des Merkmals x, erhalten zum Zeitpunkt t bei k mg % Endotoxingabe, ist größer als der Mittelwert des gleichen Merkmals, erhalten zum Zeitpunkt t ohne Endotoxinbelastung.

Bei den Enzymaktivitäten der δGT und der CHE, die sowohl bei den Nullversuchen, als auch bei allen Versuchen mit konstanter und akuter Endotoxinbelastung vollkommen übereinstimmende und zu allen Meßzeitpunkten gleichbleibende Werte zeigen, wird verständlicherweise auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Nebenbemerkung:

Da wir bezüglich der bei oben genanntem t-Test vorausgesetzten Normalverteilungen der Ergebnisse aus den fünf Versuchen Zweifel an der Anwendbarkeit des Tests hegten, wurden sämtliche Ergebnisse noch dem Wilcoxon-Test unterworfen (BASLER 1976, S. 112 f). Dieser Test ist verteilungsunabhängig, die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler zweiter Art ist hier allerdings groß. Eine 95 %-Schranke wurde auch hier zugrundegelegt.

Da die Ergebnisse bezüglich der Signifikanz des Wilcoxon-Tests mit den Ergebnissen des t-Tests übereinstimmten, schienen unsere Zweifel am t-Test ausgeräumt; lediglich bei der Aktivität der GPT ergaben sich gewisse Unterschiede, die im Kapitel 4 erwähnt werden.

4. ERGEBNISSE

4.1 Nullversuche

In 5 Versuchen ohne Endotoxinbelastung (= Nullversuche) wurden Leberfluß, Gallefluß, pO_2, sowie die Aktivitäten der Enzyme GOT, GPT, LDH, GT und CHE bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuche dienten als Bezugsgrößen: sie wurden den jeweiligen Meßwerten der Versuche mit Endotoxingabe verglichen, um die Hypothesen über eine signifikante Zu- und Abnahme zu prüfen.

(Die genauen Mittelwerte und ihre Standardabweichungen zu allen Zeitpunkten sind in den nachfolgenden Kapiteln aufgeführt).

Der L e b e r f l u ß lag bei den fünf Nullversuchen zu Beginn zwischen 22 ml/min und 25 ml/min; er blieb bis zum Ende der Perfusion (Zeitpunkt 90 Minuten) weitgehend konstant. Um den Vergleich der jeweiligen Werte miteinander zu ermöglichen, wurde der Wert bei 0 Minuten gleich 100 % gesetzt, die Werte zu den anderen Zeitpunkten des gleichen Versuches darauf bezogen (siehe Tabelle 1; Abb. 4).

Der G a l l e f l u ß lag bei diesen fünf Versuchen zum Zeitpunkt 0 zwischen 0,049 ml/15 min und 0,085 ml/15 min (= 100 %) und ging in 90 Minuten auf 74,46 $\pm$ 6,77 % (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) zurück. Er zeigte also auch ohne Endotoxinbelastung eine Abnahme (siehe Tabelle 2; Abb. 5).

Die prähepatisch-posthepatische S a u e r s t o f f d i f f e r e n z ($\triangle pO_2$), die großen Schwankungen unterlegen war, zeigte in allen fünf Versuchen einen Rückgang um etwa 20 % am Ende der Perfusionszeit (Standardabweichung s = $\pm$ 12 %) (siehe Tabelle 3; Abb. 6).

Die G O T - A k t i v i t ä t im Perfusat blieb bei den Nullversuchen weitgehend konstant (1,2 $\pm$ 0,837 U/l bei 0 Minuten; 1,0 $\pm$ 0,707 U/l bei 90 Minuten) (siehe Tabelle 4; Abb. 7).

Einen leichten Anstieg verzeichnete dagegen die A k t i v i t ä t d e r G P T (1,2 $\pm$ 0,837 U/l bei Beginn der Messung, 2,2 $\pm$ 0,837 U/l nach 90 Minuten) (siehe Tabelle 5; Abb. 8).

Die L D H , die sich als ein sehr empfindlicher Indikator erwies, zeigte während der Perfusion Schwankungen in ihrer Aktivität in beide Richtungen. Trotzdem war bei den Nullversuchen insgesamt ein Anstieg von 4,8 ± 5,45 U/l bei 0 Minuten auf 17,4 ± 5,77 U/l bei 90 Minuten (angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichungen) zu verzeichnen (siehe Tabelle 6; Abb. 9).

Keinen Anstieg, sondern einen vollkommen gleichbleibenden Verlauf zeigten die

γG T - A k t i v i t ä t : zu jedem Meßzeitpunkt 1 U/l

sowie die

C H E - A k t i v i t ä t : immer 22,4 U/l.

4.2 Kontinuierliche Endotoxinbelastung

15 Versuche wurden mit verschiedenen Endotoxinkonzentrationen durchgeführt, dabei Leberfluß, Gallefluß, die O_2-Differenz, sowie die Aktivitäten der GOT, GPT, LDH, γGT und der CHE bestimmt. Der Leber wurde dabei jeweils nach 30 Minuten Adaptationszeit ein Perfusionsmedium angeboten, das die entsprechende Konzentration an Endotoxin enthielt. Die Entnahmen und Messungen zum Zeitpunkt 0 erfolgten noch vor der Endotoxinperfusion.

Wir führten

5 Versuche mit 1 mg % Endotoxin
5 Versuche mit 2 mg % Endotoxin
5 Versuche mit 3 mg % Endotoxin

durch.

4.2.1 Leberfluß

Der Leberperfusatdurchfluß wurde bei kontinuierlicher Gabe von 1 mg %, 2 mg % und 3 mg % E.coli Endotoxinkonzentration im Perfusionsmedium bestimmt.

Die Werte zum Zeitpunkt 0 Minuten, also nach 30 Minuten Adaptationszeit, liegen zwischen 18 ml/min und 25 ml/min. Sie werden gleich 100 % gesetzt. Auch die anderen Ergebnisse werden in % bezogen zu dem jeweiligen Wert bei 0 Minuten ausgedrückt.

Tabelle 1 Leberdurchfluß

Zeit min	Endotoxinkonzentration mg/100 ml			
	0	1	2	3
0	100	100	100	100
5	100 ± 0	100 ± 0	98.36 ± 2.31	98.22 ± 3.92
10	100 ± 0	100.51 ± 2.03	98.67 ± 2.98	95.44 ± 4.38
15	100 ± 0	100 ± 0	98.00 ± 4.47	93.63 ± 7.43
30	99.09 ± 2.03	100 ± 0	91.02 ± 11.36	89.00 ± 6.87
45	100 ± 0	100 ± 0	87.34 ± 15.54	82.28 ± 11.84
60	99.20 ± 1.79	100 ± 0	94.01 ± 17.97	77.11 ± 13.34
75	100 ± 0	95.45 ± 10.17	81.54 ± 17.37	74.42 ± 15.29
90	100 ± 0	90.91 ± 20.30	77.82 ± 19.39	71.53 ± 15.63

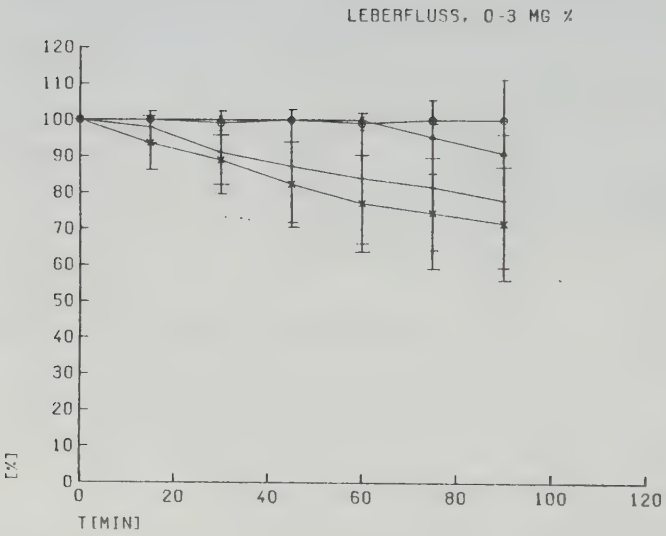
Angegeben sind die Mittelwerte (aus jeweils 5 Versuchen) ± Standardabweichung. Angabe in % bezogen auf den Wert bei Zeitpunkt 0 Minuten. Die Ergebnisse, die im Vergleich zu den Nullversuchen signifikant unterschiedlich sind, sind eingerahmt ($p < 0.05$).

Bei 1 mg % Endotoxinkonzentration ist auch nach 90-minütiger Endotoxinbelastung keine signifikante Abnahme des Leberflusses zu verzeichnen.

Bei den Versuchen mit 2 mg % Endotoxinbelastung ist der Leberfluß ab dem Zeitpunkt 75 Minuten signifikant niedriger im Vergleich zu den Kontrollversuchen ohne Endotoxingabe.

Schon nach 30 Minuten wird die Abnahme des Leberflusses bei den Versuchen mit 3 mg % Endotoxinkonzentration im Perfusionsmedium signifikant. Die Sicherheitswahrscheinlichkeit beträgt jeweils 95 %.

Abb. 4 Leberfluß



Abnahme des Leberflusses bei verschiedenen Endotoxinkonzentrationen:
Nullversuche (—o—o—), 1 mg % Endotoxin (—Δ—Δ—), 2 mg % Endotoxin (———), 3 mg % Endotoxin (—x—x—).
Angegeben sind Mittelwerte aus jeweils 5 Versuchen sowie ihre Standardabweichung. Angabe der Werte in % bezogen auf den Wert bei 0 Minuten.

E.coli Endotoxin bewirkt also eine mit steigender Konzentration zunehmende Verringerung des Leberflusses.

4.2.2 Galleﬂuß

Der Galleﬂuß wurde bei kontinuierlicher Belastung mit 1 mg %, 2 mg % und 3 mg % Endotoxin gemessen und mit den Werten ohne Endotoxingabe (Nullversuche) verglichen.

Die erste Messung erfolgte nach 30 Minuten Adaptationszeit vor Zugabe von Endotoxin (Zeitpunkt 0), dann alle 15 Minuten bis zum Zeitpunkt 90 Minuten.

Die in ml/15 min gemessenen Werte wurden in % - bezogen auf den Anfangswert (Zeitpunkt 0) - angegeben. Die Anfangswerte lagen zwischen 0,039 ml/15 min und 0,093 ml/15 min.

Tabelle 2 Galleﬂuß

Zeit min	Endotoxinkonzentration mg/100 ml			
	0	1.0	2.0	3.0
0	100	100	100	100
15	80.64 ± 7.44	81.01 ± 5.97	74.07 ± 7.81	68.69 ± 12.71
30	76.17 ± 7.29	76.45 ± 15.48	70.58 ± 12.25	63.90 ± 10.83
45	78.79 ± 4.91	72.05 ± 11.09	62.57 ± 9.84	59.88 ± 10.43
60	71.47 ± 10.23	68.43 ± 18.02	53.22 ± 5.31	51.28 ± 10.48
75	75.33 ± 9.77	64.79 ± 4.12	54.01 ± 10.01	52.36 ± 9.83
90	74.46 ± 6.77	55.49 ± 14.10	51.34 ± 11.09	46.64 ± 11.96

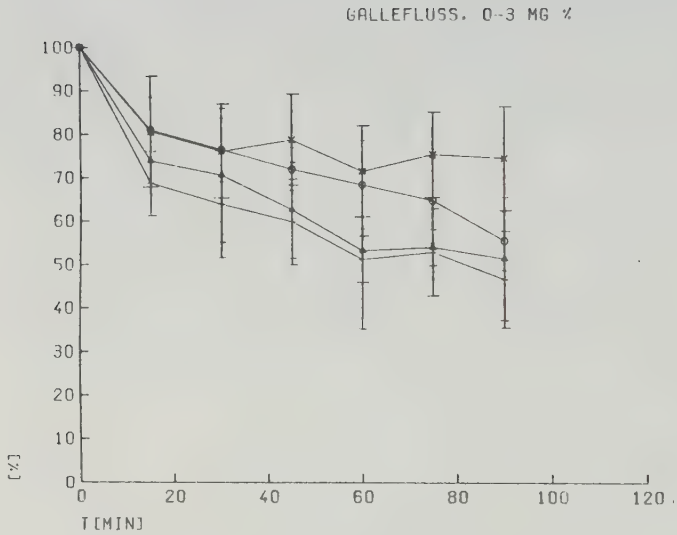
Angegeben sind die Mittelwerte aus 5 Versuchen ± Standardabweichung. Angabe in %, bezogen auf Anfangswert bei 0 Minuten, der gleich 100 gesetzt wird. Die eingerahmten Werte zeigen eine signifikante Abnahme im Vergleich zu den Nullversuchen ($p < 0.05$).

Je höher die Konzentration an Endotoxin ist, desto stärker ist die Abnahme des Galleflusses im Vergleich zu den Nullversuchen. Signifikant wird sie

bei 1 mg % nach 75 Minuten
bei 2 mg % nach 45 Minuten
bei 3 mg % nach 30 Minuten.

Auch hier wird eine Sicherheitswahrscheinlichkeit von 95 % zugrundegelegt.

Abb. 5 Gallefluß



Abnahme des Galleflusses bei verschiedenen Endotoxinkonzentrationen:
0 mg % (—x—x—), 1 mg % (—o—o—), 2 mg % (—Δ—Δ—), 3 mg % (————).
Angegeben sind Mittelwerte aus 5 Versuchen ± Standardabweichung.
Angabe in % zum Anfangswert.

4.2.3 Gaswerte

Die Sauerstoffkonzentration im Perfusionsmedium wurde prähepatisch und posthepatisch bestimmt und daraus zu jedem Meßzeitpunkt die Sauerstoffdifferenz ΔpO_2 errechnet.

Die Ergebnisse - also die O_2-Differenzen bei den Versuchen mit 1 mg %, 2 mg % und 3 mg % Endotoxin - wurden mit den Werten, die die Nullversuche brachten, verglichen. Auch dazu war es notwendig, diese Werte in % zum Ausgangswert auszudrücken. Die Sauerstoffdifferenzen hatten bei den verschiedenen Versuchen zum Zeitpunkt 0 Werte zwischen 154 und 271 mm Hg.

Tabelle 3 O_2-Differenz

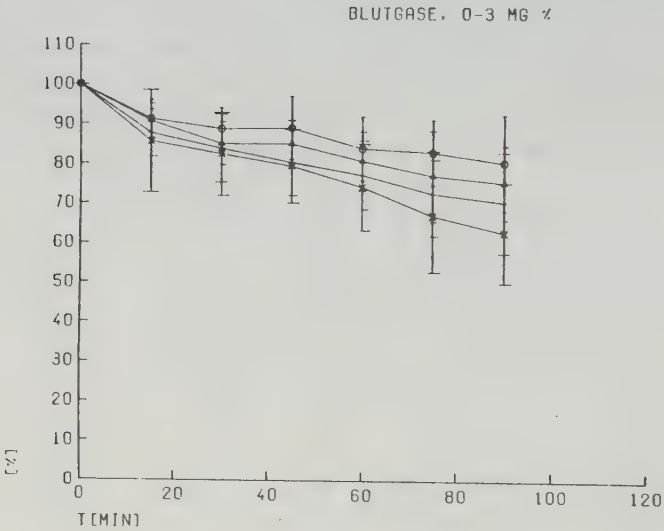
Zeit min	Endotoxinkonzentration mg/100 ml			
	0	1.0	2.0	3.0
0	100	100	100	100
5	95.38 ± 6.13	97.48 ± 5.40	94.94 ± 3.03	94.83 ± 3.79
10	89.62 ± 6.54	90.65 ± 6.86	92.70 ± 9.30	90.93 ± 6.56
15	91.27 ± 4.48	90.74 ± 4.36	87.68 ± 5.91	85.70 ± 12.93
30	88.80 ± 5.35	85.14 ± 5.49	83.93 ± 8.64	82.44 ± 10.55
45	89.16 ± 7.91	85.05 ± 5.96	80.41 ± 8.31	79.46 ± 9.30
60	84.02 ± 8.13	80.80 ± 7.49	77.31 ± 8.71	74.26 ± 10.99
75	83.03 ± 8.21	77.00 ± 11.46	72.66 ± 10.81	67.03 ± 14.17
90	80.44 ± 12.11	75.31 ± 9.34	70.35 ± 12.76	62.71 ± 12.63

Angabe der Mittelwerte aus jeweils 5 Versuchen ± Standardabweichung. Die Werte sind in % zum Wert beim Zeitpunkt / umgerechnet. Die Ergebnisse, die signifikant unterschiedlich sind zu den entsprechenden Werten der Nullversuche, sind eingerahmt ($p < 0.05$).

Aufgrund der großen Streuung der Werte und der dadurch bedingten großen Standartabweichungen findet sich eine signifikant erniedrigte Sauerstoffdifferenz nur bei der Versuchsreihe mit 3 mg %

Endotoxin. Signifikant ist der Unterschied ab dem Zeitpunkt 75 Minuten mit einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von 95 %.

Abb. 6 O_2-Differenz



Abnahme der Sauerstoffdifferenz bei verschiedenen Konzentrationen von E.coli Endotoxin. Nullversuche (—o—o—), 1 mg % (—Δ—Δ—), 2 mg % (———), 3 mg % (—x—x—). Aufgezeichnet sind die Mittelwerte aus 5 Versuchen ± Standardabweichung.

Endotoxin führt also bei genügend hoher Konzentration im Perfusionsmedium zu einer Abnahme der prähepatisch-posthepatischen Sauerstoffdifferenz.

4.2.4 Enzymaktivitäten

Anhand der posthepatisch entnommenen Perfusatproben wollten wir feststellen, ob und wie deutlich sich die Aktivitäten bestimmter Indikator- und Sekretionsenzyme bei kontinuierlicher Endotoxinbelastung verändern.

G O T - A k t i v i t ä t

Im Gegensatz zu den Nullversuchen zeigt die GOT bei allen Endotoxinkonzentrationen einen Anstieg ihrer Aktivität im Verlaufe der Perfusion.

Tabelle 4 GOT-Aktivität

Zeit min	Endotoxinkonzentration in mg/100 ml			
	0	1.0	2.0	3.0
0	1.2 ± 0.837	2.2 ± 1.304	1.8 ± 0.447	1.4 ± 0.894
5	0.6 ± 0.548	1.2 ± 0.837	1.6 ± 1.140	1.0 ± 1.000
10	1.0 ± 1.000	1.2 ± 0.837	1.4 ± 0.894	1.0 ± 1.000
15	1.2 ± 0.837	1.6 ± 0.894	2.1 ± 1.025	1.6 ± 0.548
30	1.2 ± 0.837	1.8 ± 0.447	1.8 ± 0.837	2.0 ± 1.225
45	1.0 ± 0.707	1.8 ± 1.095	2.4 ± 1.140	2.8 ± 1.304
60	1.0 ± 1.000	2.0 ± 1.000	2.6 ± 0.894	2.8 ± 0.837
75	1.2 ± 0.447	3.0 ± 1.000	2.8 ± 0.837	3.0 ± 1.225
90	1.0 ± 0.707	3.8 ± 1.095	3.8 ± 0.837	4.2 ± 0.837

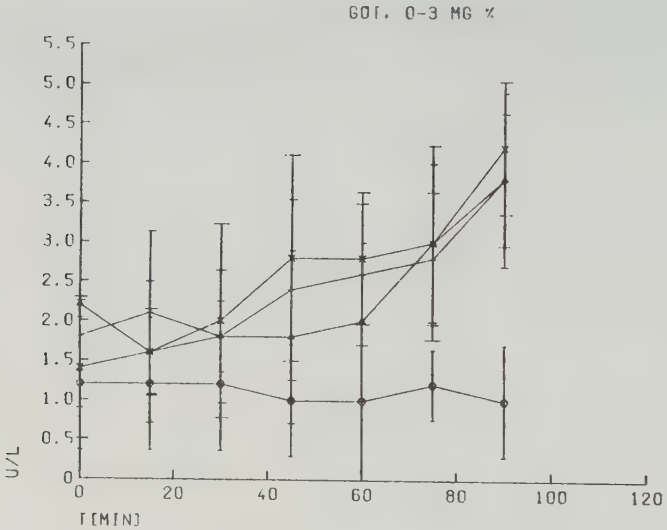
Alle Werte in U/l. Angegeben sind die Mittelwerte aus 5 Versuchen ± Standardabweichung. Werte, die signifikant unterschiedlich zu den Nullversuchen sind, sind eingerahmt. ($p < 0.05$).

Signifikant wird der Anstieg ($p < 0.05$) bei einer Endotoxinkonzentration von

1 mg %	ab Zeitpunkt 75 Minuten
2 mg %	ab Zeitpunkt 45 Minuten
3 mg %	ab Zeitpunkt 45 Minuten.

Bei einer Belastung mit 3 mg % Endotoxin wird nach 90-minütiger Endotoxinbelastung dreifache Aktivität freigesetzt im Vergleich zum Wert im Nullversuch bei 90 Minuten.

Abb. 7 GOT-Aktivität



Zunahme der GOT-Aktivität im Perfusat bei verschiedenen Endotoxinkonzentrationen:
0 mg % (—o—o—), 1 mg % (—Δ—Δ—), 2 mg % (———), 3 mg % (—x—x—). Angabe der Mittelwerte und ihrer Standardabweichung. Zahl der Versuche in jedem Meßwert: 5.

Aus Abb. 4 geht hervor, daß der Anstieg desto steiler verläuft, je höher die Endotoxinkonzentration ist.

G P T - A k t i v i t ä t

Die GPT-Aktivität im posthepatischen Perfusat, die schon bei den Nullversuchen einen leichten Anstieg erkennen läßt, steigt bei Endotoxinbelastung noch stärker an.

Tabelle 5 GPT-Aktivität

Zeit min	Endotoxinkonzentration (mg/100 ml)				
	0	1.0	2.0	3.0	
0	1.2 ± 0.837	0.8 ± 0.837	1.6 ± 1.140	1.0 ± 1.000	
5	0.8 ± 0.837	1.2 ± 1.304	1.0 ± 1.000	1.0 ± 0.707	
10	1.0 ± 1.000	1.0 ± 1.225	1.4 ± 1.140	1.1 ± 0.742	
15	1.2 ± 0.447	1.2 ± 0.447	2.0 ± 1.225	1.7 ± 0.447	
30	1.2 ± 0.837	1.1 ± 0.548	1.4 ± 1.342	1.8 ± 0.837	
45	1.0 ± 0.707	1.3 ± 0.975	2.2 ± 1.643	2.2 ± 0.837	
60	1.2 ± 0.837	1.8 ± 0.447	2.4 ± 0.548	2.6 ± 0.844	
75	1.3 ± 0.837	2.6 ± 1.517	2.4 ± 0.548	3.2 ± 1.304	1)
90	2.2 ± 0.837	3.4 ± 0.894	3.6 ± 0.894	5.2 ± 0.447	1)

Alle Werte in U/l. Angegeben sind Mittelwerte aus 5 Versuchen ± Standardabweichungen. Nach dem t-Test signifikant unterschiedliche Werte zu den Nullversuchen sind eingerahmt ($p < 0.05$).
1) = signifikant nach dem Wilcoxon-Test (Irrtumswahrscheinlichkeit 5%).

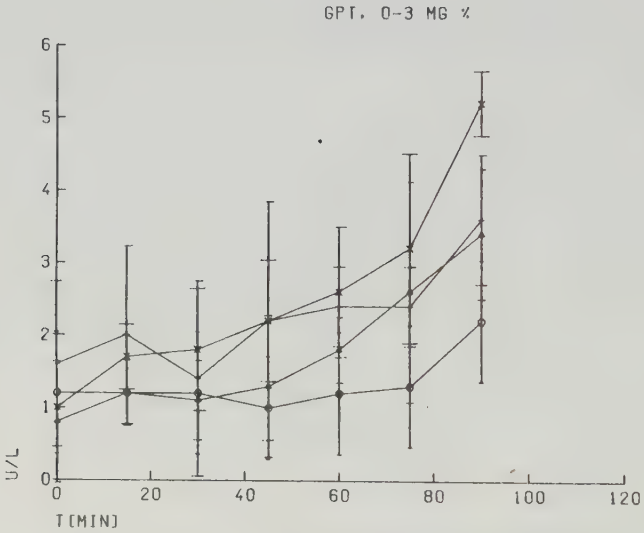
Bei der statistischen Auswertung (Vergleich der Endotoxinwerte mit den Nullwerten) ergaben sich Diskrepanzen bezüglich der Signifikanz:
Beim t-Test (p 0.05) wurde der Aktivitätsanstieg gegenüber den Nullversuchen

bei 1 mg % Endotoxin ab Zeitpunkt 90 Minuten
bei 2 mg % Endotoxin ab Zeitpunkt 60 Minuten
bei 3 mg % Endotoxin ab Zeitpunkt 45 Minuten

signifikant.

Der verteilungsunabhängige Wilcoxon-Test (siehe Kapitel 3.4) läßt nur die Werte bei 3 mg % Endotoxinbelastung ab 75 Minuten signifikant höher zu den Nullversuchen werden.

Abb. 8 GPT-Aktivität



Zunahme der GPT-Aktivität im Perfusat bei verschiedenen Endotoxinkonzentrationen:
Nullversuche (—o—o—), 1 mg % (—Δ—Δ—), 2 mg % (————), 3 mg % (—x—x—). Angabe der Mittelwerte und ihrer Standardabweichung. Zu jedem Meßwert 5 Versuche.

Aus Abb. 8 geht hervor, daß die Mittelwerte desto stärker ansteigen, je höher die Konzentration und je länger die Dauer der Endotoxinbelastung ist.

L D H - A k t i v i t ä t

Die Aktivität der Laktatdehydrogenase zeigt anfangs einen schwankenden Verlauf, der wahrscheinlich die Empfindlichkeit dieses Enzyms auch gegenüber äußeren Reizen auf die Leber (die nie ganz vermieden werden können) anzeigt. Erst bei Endotoxinbelastung und längerer Perfusionszeit wird ein Aktivitätsanstieg im posthepatischen Perfusat deutlich.

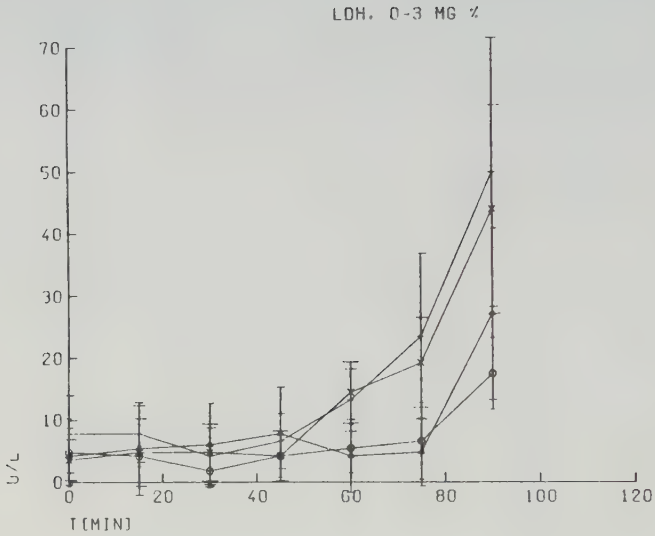
Tabelle 6 LDH-Aktivität

Zeit min	Endotoxinkonzentration (mg/100 ml)			
	0	1.0	2.0	3.0
0	4.8 ± 5.45	4.2 ± 4.55	7.8 ± 6.22	3.6 ± 3.29
5	2.4 ± 2.51	3.6 ± 4.93	4.8 ± 3.42	4.8 ± 2.68
10	1.8 ± 1.64	4.2 ± 5.02	6.0 ± 4.74	5.4 ± 6.50
15	4.2 ± 1.64	5.4 ± 7.47	7.8 ± 4.55	4.8 ± 5.45
30	1.8 ± 2.68	6.0 ± 6.71	4.2 ± 4.55	4.8 ± 4.55
45	4.2 ± 3.42	7.8 ± 7.53	6.6 ± 4.45	4.2 ± 4.02
60	5.4 ± 3.91	4.2 ± 5.85	13.2 ± 5.02	14.4 ± 4.93
75	6.6 ± 6.15	4.8 ± 5.45	23.4 ± 13.32	19.2 ± 7.23
90	17.4 ± 5.77	27.0 ± 13.75	49.8 ± 21.59	43.8 ± 16.78

Alle Werte in U/l. Angabe der Mittelwerte aus 5 Versuchen ± Standardabweichung. Werte, die signifikant unterschiedlich zu den Nullversuchen sind, sind eingerahmt ($p < 0.05$).

Signifikant werden die Aktivitäten der LDH bei 2 mg % und bei 3 mg % Endotoxinperfusion jeweils nach 60 Minuten; dagegen ist bei 1 mg % Endotoxinkonzentration kein signifikant höherer Wert als in den Nullversuchen ersichtlich.

Abb. 9 LDH-Aktivität



Zunahme der LDH-Aktivität bei verschiedenen Endotoxinkonzentrationen:
0 mg % (—o—o—), 1 mg % (—Δ—Δ—), 2 mg % (————), 3 mg % (—x—x—). Angabe der Mittelwerte und ihrer Standardabweichungen. Jeweils 5 Versuche.

Abb. 9 zeigt beim Anstieg der LDH-Aktivität keine deutliche Abhängigkeit von der Höhe der Endotoxinkonzentration. Der 2 mg %-Wert bei 90 Minuten liegt sogar etwas über dem entsprechenden Wert bei 3 mg %. Deutlich ist aber, daß nach 90 Minuten bei beiden Konzentrationen (2 mg % und 3 mg %) eine höhere Aktivität im Perfusat festgestellt wird als bei den Nullversuchen.

γGT - Aktivität

Die γ-Glutamyltransferase zeigt in keinem der 15 Versuche mit kontinuierlicher Endotoxinbelastung einen Anstieg ihrer Aktivität im Perfusat. Wie bei den Nullversuchen liegt der Wert bei allen Zeitpunkten bei 1 U/l. Eine grafische oder tabellarische Aufzeichnung erübrigt sich daher.

CHE - Aktivität

Die Cholinesterase, ein Sekretionsenzym der Leber, zeigt in allen Versuchen, bei allen Endotoxinkonzentrationen (o mg %, 1 mg %, 2 mg % und 3 mg %) eine Aktivität im posthepatischen Perfusat von 22,4 U/l.
Auch hier wird auf Tabelle und Grafik verzichtet.

4.3 Akute Endotoxinbelastung

Der Verzicht auf ein rezirkulierendes System bringt unter anderem auch den Vorteil, daß die Wirkung von kurz - aber in hoher Dosierung - einwirkendem Endotoxin beobachtet werden kann.

Während bei den Versuchen mit konstanter Gabe von 3 mg % in 90 Minuten insgesamt ca. 6 mg Endotoxin die Leber passierten, wurden bei den Akutversuchen 20 mg E.coli Endotoxin zum Zeitpunkt 0 hochkonzentriert der Leber angeboten. Wie im Kapitel 3.2.5 hergeleitet, durchströmte damit eine Lösung mit 30 mg % Endotoxin ungefähr 3 - 4 Minuten lang die Leber.

Insgesamt führten wir fünf Versuche mit akuter Endotoxingabe durch.

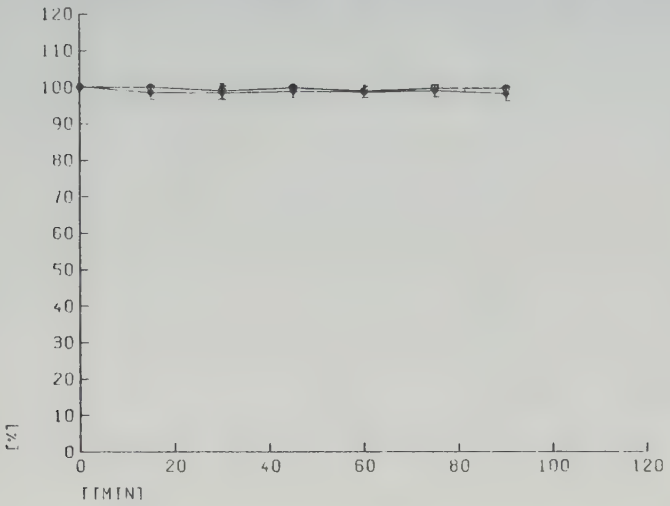
Beim Vergleich der Ergebnisse der Akutversuche mit denen der Nullversuche fällt auf, daß keiner der Meßwerte einen signifikanten Unterschied zu den Nullversuchen zeigt:

Tabelle 7 Akute Endotoxinbelastung (n = 5)

Zeit min	Leberfluß	Galleﬂuß	
0	100	100	
5	100.45 ± 1.02	-	
10	98.62 ± 1.89	-	
15	98.62 ± 1.89	81.79 ± 8.46	
30	98.62 ± 1.89	74.62 ± 10.65	
45	98.95 ± 1.58	73.08 ± 10.57	
60	98.92 ± 1.60	71.26 ± 13.20	
75	99.29 ± 1.60	76.15 ± 8.79	
90	98.55 ± 1.99	68.10 ± 7.49	
	% zum Wert bei 0 min	% zum Wert bei 0 min	
	GOT	GPT	LDH
0	1.0 ± 1.0	1.8 ± 0.84	3.0 ± 3.0
5	0.8 ± 0.84	1.2 ± 0.84	3.6 ± 3.91
10	1.0 ± 0.71	1.2 ± 1.10	3.6 ± 2.51
15	1.4 ± 0.55	1.0 ± 1.22	5.4 ± 4.45
30	1.4 ± 1.34	1.2 ± 0.84	3.6 ± 3.29
45	1.8 ± 0.84	0.8 ± 0.84	7.2 ± 1.64
60	1.6 ± 1.14	1.2 ± 1.30	9.0 ± 3.00
75	1.6 ± 0.89	2.0 ± 1.41	9.0 ± 6.00
90	2.0 ± 1.00	1.4 ± 1.14	15.4 ± 6.54
	U/l	U/l	U/l

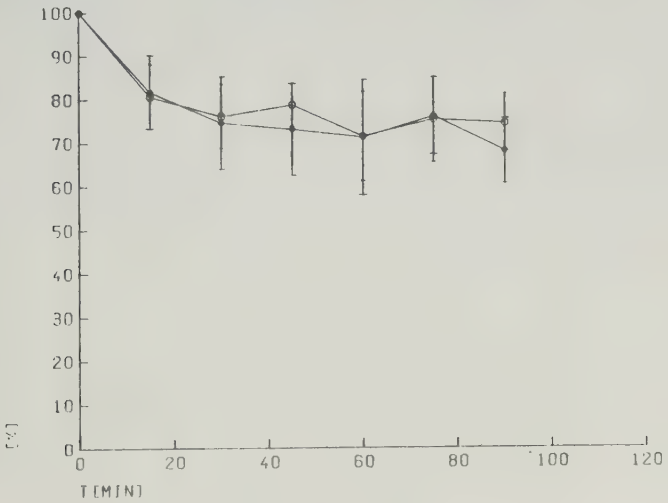
Auch die Aktivitäten der GT und der CHE betragen wie bei allen vorausgegangenen Versuchen 1 U/l bzw. 22,4 U/l zu allen Meßzeitpunkten.

Abb. 10 Leberfluß bei akuter Endotoxingabe und ohne Endotoxin



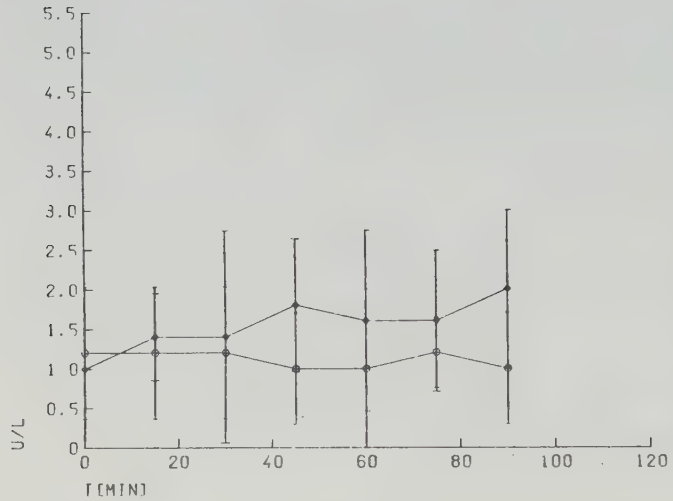
Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 5 Versuchen.
Akute Gabe (—◇—◇—), Nullversuch (—○—○—).

Abb. 11 Gallefluß bei akuter Endotoxingabe und bei endotoxinfreier Perfusion (Nullversuch)



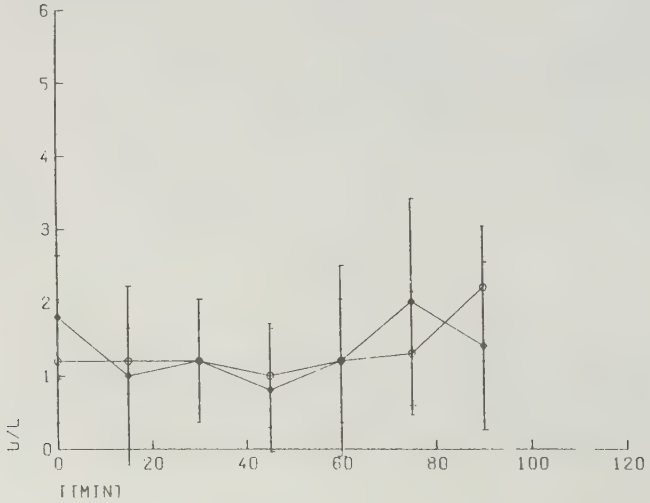
Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 5 Versuchen.
Akute Gabe (—◇—◇—), Nullversuch (—○—○—).

Abb. 12 GOT-Aktivität bei akuter Endotoxingabe und bei Kontrollversuch



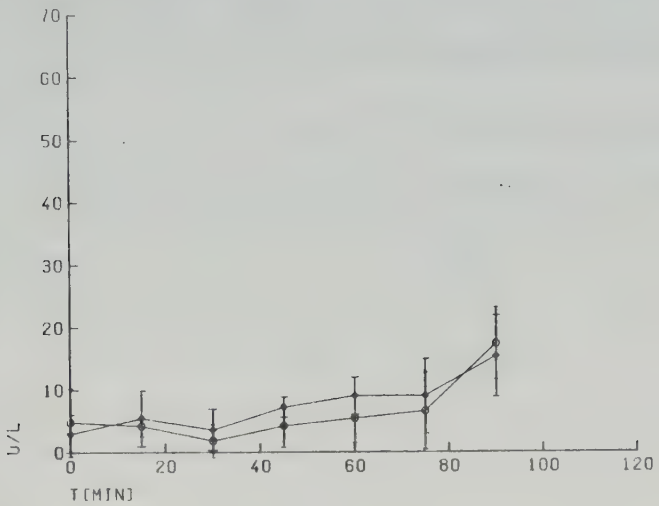
Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 5 Versuchen.
Akute Gabe (—◇—◇—), Nullversuch (—○—○—).

Abb. 13 GPT-Aktivität bei akuter Endotoxingabe und im Nullversuch



Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 5 Versuchen.
Akute Gabe (—◇—◇—), Nullversuch (—○—○—).

Abb. 14 LDH-Aktivität bei akuter Endotoxinbelastung und im Nullversuch



Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 5 Versuchen.
Akute Gabe (—◇— ◇—), Nullversuch (—o——o—).

Im t-Test wurden die Werte der Akutversuche mit den Werten der Nullversuche verglichen. Bei einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von 95 % ($p < 0.05$) wurde kein signifikanter Unterschied gefunden.

Aus Abb. 10 - 14 lassen sich zwei wichtige Aussagen herleiten:

1. Es kommt zu keiner kurzfristigen Änderung der Meßwerte bei akuter Endotoxingabe:
   keine akute Beeinflussung der Meßwerte; d.h., daß 1 - 2 Minuten nach akuter Endotoxinbelastung, also zum Zeitpunkt 5, keine Reaktion der Leber zu sehen war.
2. Auch im Verlauf der weiteren Perfusion änderten sich die Werte im Vergleich zu den Nullversuchen nicht:
   keine Änderung analog zu den Versuchen mit kontinuierlicher Belastung.

5. DISKUSSION

5.1 Kontinuierliche Endotoxingabe

5.1.1 Verminderung des Leberflusses

Eine Abnahme des Leberdurchflusses bei Endotoxineinwirkung - was wir auch in unseren Versuchen bestätigen konnten - ist bereits in vielen in vivo und in vitro Versuchen nachgewiesen worden, ohne daß die Autoren eine schlüssige Erklärung für diesen Sachverhalt angeben konnten. Unsere Untersuchungsmethodik erlaubt allerdings, einige Erklärungsversuche zu widerlegen bzw. zu erhärten.

Wie wichtig die Vorgänge an den Gefäßen der Leber für die sich entwickelnde Kreislaufinsuffizienz des Gesamtorganismus beim Endotoxinschock sind, verdeutlicht folgender pathophysiologischer Ablauf, den BLATTBERG et al. (1970) an Tierversuchen demonstrierten:

Primär entwickelt sich eine Venolenkontraktion in der Leber. Als Folge davon steigt der Druck in der Pfortader und in der Arteria hepatica an. Es entsteht ein Pooling im Leber-Milz-Bereich. Dadurch verringert sich der venöse Rückfluß und - als Folge - das Herzzeitvolumen. Da dadurch auch der arterielle Druck abfällt, werden vasoaktive Substanzen freigesetzt. Es entsteht das Vollbild des Schocks.

Eine mögliche Erklärung für den verringerten Durchfluß geben elektronenmikroskopische Untersuchungen der Endotoxin-Schockleber (Mc KAY et al. 1967; LEVY et al. 1968). Dabei wurde ein Anschwellen der Kupfferzellen sowie eine Ablagerung von Verschlußmassen aus Leukozyten, Plättchen und Fibrin in den Lebersinusoiden gesehen. Verschlußmassen kommen in unserem Fall nicht in Frage, da wir ein synthetisches Perfusionsmedium benutzten. Ursache des Anschwellens der Kupfferzellen kann nach BOYER (1971) die Hemmung der K-Na-ATPase sein.

In zwei weiteren Veröffentlichungen, die sich mit den Wirkungen von Endotoxin auf den Leberfluß befassen (MULLER et al. 1963; MOSES et al. 1963), wird der verminderte Durchfluß mit dem verringerten Herzzeitvolumen bzw. mit der akuten Reduktion des Plasma-

volumens im Schock erklärt. In unserer Versuchsanordnung wurde der Perfusionsdruck konstant gehalten; da trotzdem die Verringerung des Leberflusses offenkundig war, erklärt diese Vermutung unsere Ergebnisse nicht.

Viele Autoren richten ihr Augenmerk auf Mediatorstoffe, die nach ihnen die Gefäßreaktion in der Leber erklären sollen. Genannt werden in diesem Zusammenhang Adrenalin und Noradrenalin (HEIFFER et al. 1968; ZWEIFACH et al. 1956), Histamin - entweder direkt oder über Katecholaminfreisetzung - (HINSHAW et al. 1961) sowie Serotonin und weitere vasoaktive Polypeptide (KOBOLD et al. 1963; NOLAN et al. 1965). In unseren Versuchen war die Leber aber unabhängig von nervaler und humoraler Beeinflussung. Lediglich in der Leber gebildete Mediatorstoffe könnten bei uns eine Rolle spielen. Diese müßten aber sofort an ihren Wirkungsort gelangen, da wir kein rezirkulierendes System verwendeten, der Leber also ständig frisches Perfusionsmedium angeboten wurde. Darüberhinaus zeigten HINSHAW et al. (1966) an Hundelebern, daß Inhibitoren der Mediatorstoffe die Gefäßkonstriktion nicht aufhoben.

HINSHAW et al. (1966) führen als mögliche Erklärung einen direkten Angriff des Endotoxins an den Lebergefäßen an. Damit ließe sich auch die Wirkung an der isoliert perfundierten Rattenleber erklären. Zwei weitere Erklärungen, die HINSHAW et al. anführen, nämlich daß Endotoxin auf die zellulären Bestandteile des Blutes in irgendeiner Weise einwirkt und so zu einer Verlangsamung des Blutstromes führt, weiterhin die schon erwähnten Wirkungen auf das Gerinnungssystem, können auf unsere Ergebnisse nicht angewendet werden.

Bleiben also drei mögliche Mechanismen, die der Verminderung des Leberflusses durch Endotoxin an der isoliert perfundierten Rattenleber als Erklärung dienen können:

1. Endotoxin könnte in der Leber irgendwelche vasoaktive Substanzen freisetzen, die an Ort und Stelle ihre Wirkung auf die Gefäße entfalten.
2. Endotoxin wirkt direkt auf die Lebervenolen, ist also selbst vasoaktiv.

3. Das Anschwellen der Kupfferzellen erhöht den Widerstand im intrahepatischen Stromgebiet. Mögliche Ursache der Zellvergrößerung ist eine Hemmung der K-Na-ATPase durch Endotoxin.

5.1.2 Cholestatische Wirkungen

In der Literatur finden wir mehrere Berichte über ein Zusammentreffen von Infektionen der Harnwege und ikterischen Erscheinungen bei Neugeborenen und Säuglingen (SEELER et al. 1969; NG et al. 1971; KENNY et al. 1966; ARTHUR et al. 1967).

Als Ursache dieser klinischen Erscheinungen vermuten die Autoren die Sepsis, die ihrerseits zum Ikterus führt durch

a) Hämolyse (SEELER et al. 1969; NG et al. 1971)
b) toxische Hepatitis (SEELER; NG)
c) Cholestase (ARTHUR et al. 1967).

Unsere Ergebnisse offenbaren nun, daß zumindest die Vermutung von ARTHUR et al. an der isoliert perfundierten Rattenleber zu beweisen ist: Endotoxin bewirkte in unseren Versuchen einen konzentrationsabhängigen Abfall des Galleflusses. Ebenso ergaben Leberbiopsien bei Patienten mit Harnwegsinfektionen und daraus resultierenden ikterischen Erscheinungen das histologische Bild einer intrahepatischen Cholestase (KENNY et al. 1966).

Um sich von der Art und Weise, wie Endotoxin in das System der Gallensekretion hemmend einwirkt, ein Bild zu machen, sollen kurz die heutigen Vorstellungen von der Physiologie der Galleausscheidung skizziert werden:

Bisher wurde angenommen, daß die hepatozytäre Gallensäuresekretion - durch galleassoziierte Ionen bedingt - passiv Wasser und Elektrolyte nachfolgen läßt (SCHMID, 1976). Diese Vorstellung gilt heute als überholt. WHEELER et al. (1968) hat an Hunden gezeigt, daß der Gallefluß zum Teil unabhängig von der Gallensäureausscheidung ist. ERLINGER et al. (1970) und BOYER et al. (1970) demonstrierten an Kaninchen bzw. an der isoliert perfundierten Rattenleber, daß Galle auch bei Fehlen einer signifikanten Gallensäureausscheidung sezerniert wird. Dieser gallensäureunabhängige Fluß (BSIF = bile salt-independent flow) hat an der gesamten Galleproduktion einen Anteil von 20 - 60 % (BOYER et al. 1975).

Für die Verminderung des Galleflusses unter Endotoxineinwirkung kommen also folgende Möglichkeiten in Betracht:

1. Reduzierter Leberfluß verursacht eine Verminderung des Galleflusses.
2. Gallefluß wird eingeschränkt durch verminderte Konjugation und damit Sekretion von Gallensäuren.
3. Der gallensäureunabhängige Fluß (BSIF) geht zurück.

UTILI et al. (1976) zeigten, daß eine künstliche Verminderung des Leberflusses (bis zu 26 %) an der isoliert perfundierten Rattenleber den Gallefluß nicht beeinträchtigt. Diese Erklärungsmöglichkeit entfällt damit.

Die selben Autoren (UTILI et al. 1976; UTILI et al. 1977) konnten in ihren Experimenten darüberhinaus die Hemmung der Konjugation als Ursache der Galleflußverminderung ausschließen: Sie gaben Indocyaningrün und Bromsulfthalein zum Perfusionsmedium und analysierten die Ergebnisse. Da Endotoxin die Ausscheidung von Indocyanin (das nicht konjugiert ausgeschieden wird) und BSP (das zur Ausscheidung konjugiert werden muß) in gleicher Weise verminderte, liegt die Vermutung nahme, daß die cholestatische Wirkung von Endotoxin nicht in Beziehung steht zur Konjugation der Gallensäuren. Man darf also annehmen, daß Endotoxin hauptsächlich den BSIF hemmt.

Interessant in diesem Zusammenhang sind Untersuchungen (BOYER 1971; BOYER et al. 1975), die zeigten, daß die gallensäureunabhängige Sekretion durch Hemmung der Na-K-ATPase (mit Herzglycosiden, Na^+ Konzentrationserhöhung; Änderung der für dieses Enzym optimalen Temperatur) vermindert wird. Trifft es zu, daß der BSIF vom aktiven Na^+- Transport determiniert ist, dann wäre als möglicher Mechanismus bei der Verringerung des Galleflusses an einen direkten Angriff des Endotoxins an der Na-K-ATPase zu denken.

Insgesamt läßt sich feststellen, daß unsere Ergebnisse mit der Vermutung in Einklang stehen, daß der Ikterus bei gramnegativen Infektionen auf eine von Endotoxin bewirkte Cholestase zurückzuführen ist.

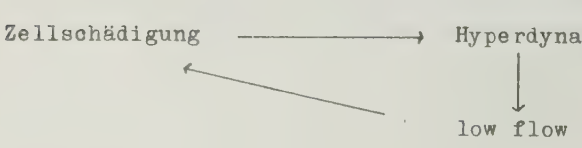
5.1.3 Veränderung der O_2-Differenz

Die Versuche an der isoliert perfundierten Rattenleber haben gezeigt, daß bei 3 mg % kontinuierlicher Endotoxinperfusion die Differenz zwischen prähepatischen und posthepatischen Oxygenwerten abnimmt.

Eine verringerte arteriovenöse Sauerstoffdifferenz wird auch bei Patienten mit Septikämie beobachtet. COHN et al. (1968) fanden bei einem Kollektiv von 26 Patienten mit Septikämie eine arteriovenöse O_2-Differenz von 2.92 $\pm$ 0.48 Volumenprozent, während der vergleichbare Wert bei gesunden Personen bei 4.5 Volumenprozent liegt.

Groß ist die Zahl der Erklärungsversuche für diesen Sachverhalt: MILLER et al. (1970) fanden bei Patienten im septischen Schock erniedrigte Werte für das intrazelluläre 2,3 DPG der Erythrozyten. Das würde die O_2-Affinität des Hämoglobins erhöhen und wäre eine Erklärung für die veränderte Sauerstoffdifferenz. Da wir mit einem erythrozytenfreien Perfusionsmedium arbeiteten, kann dieser Mechanismus unsere Ergebnisse nicht erklären. Mit peripheren Gefäßshunts, also mit arteriovenösen Kurzschlüssen erklären COHN et al. (1968) die erniedrigte O_2-Differenz, da bei septischen Schockpatienten gleichzeitig ein hyperdynamischer Zustand (anfangs erhöhtes HMV) besteht. Da wir mit einem isolierten System arbeiteten, also nur die Vorgänge im Organ betrachteten, kann auch diese Erklärung nicht auf unsere Ergebnisse angewandt werden.

Vermutet werden auch Wirkungen des Endotoxins auf die Zellen, bzw. in den Zellen: Ein solcher Pathomechanismus, nämlich eine primäre Schädigung der Zelle oder der Zellfunktionen durch Endotoxin, die zu einer Beeinträchtigung der oxidativen Stoffwechselvorgänge in der Zelle führt, wird von WRIGHT et al. (1971) vermutet. Nach ihren Vorstellungen läuft folgender Vorgang an der Zelle ab:



Voraussetzung für ein Eingreifen des Endotoxins in die Stoffwechselvorgänge in der Leberzelle wäre aber, daß Lipopolysaccharide in die Zelle gelangen können. Das konnten HARKEN et al. (1975) an Kaninchenlebern nachweisen. Wenn Escherichia coli Endotoxin einwirkte, nahm der O_2-Verbrauch sowohl in homogenisierten als auch in intakten Hepatozyten gleichmäßig ab.

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Leberzellen nach Endotoxineinwirkung wurde von einigen Autoren ein Anschwellen der Mitochondrien und eine Auflösung ihrer inneren Architektur beschrieben (SCHUMER et al. 1970; LEVY et al. 1968). Da sich in den Mitochondrien die wichtigen oxidativen Stoffwechselvorgänge abspielen, scheinen Veränderungen an diesen Zellorganellen als Erklärung unserer Ergebnisse möglich. Bestätigt wird diese Möglichkeit auch durch Untersuchungen, die MELA et al. (1970) anstellten: Sie untersuchten die Enzyme von Mitochondrien, die durch Endotoxin geschädigt wurden und fanden

1. eine Hemmung der Succinat-Oxidation
2. eine Hemmung der Glutamat- und Malat-Oxidation
3. eine Verminderung der K-Na-ATPase.

Die verminderte Sauerstoffdifferenz bei gleichzeitigem Absinken des pH-Wertes in unseren Versuchen läßt sich befriedigend mit dem Angriff des Endotoxins auf die Mitochondrien und daraus folgender Hemmung der genannten Enzyme erklären.

Unter Umständen wäre die Wirkung des Endotoxins auf die prähepatisch-posthepatische O_2-Differenz in unseren Versuchen noch deutlicher ausgefallen, wenn wir in unserem Perfusionsmedium nicht Rinder-Serum-Albumin verwendet hätten. SCHUMER et al. (1970) berichten, daß bovines Serumalbumin (BSA) eine restorative Wirkung auf Mitochondrien von endotoxingeschädigten Ratten hat. Eine durch BSA erhöhte Effizienz der oxidativen Phosphorilierung wurde von HELINSKI et al. (1960) beschrieben. Diese Autoren vermuten, daß BSA langkettige freie Fettsäuren binden und so hemmende und entkoppelnde Agentien entfernen. MELLORS et al. (1967) fanden Hinweise, daß BSA den Entkoppelungsmechanismus durch lysosomale Membranfragmente vermindert.

Möglicherweise sind freie Fettsäuren oder lysosomale Membranfragmente verantwortlich für die Änderung der Funktion und der Morphologie der Mitochondrien bei Endotoxineinwirkung.

5.1.4 Veränderung der Enzymaktivitäten

Eine Standartmethode zur Erkennung des Ausmaßes einer Leberzellschädigung ist die Messung der Serumenzymwerte. Am lebenden Tier werden von mehreren Autoren Enzymaktivitätsanstiege nach Gabe von subletalen und letalen Dosen Endotoxin beobachtet. Zwei Fragen sollten damit vor allem beantwortet werden:

1. Ist die Höhe der Enzymanstiege ein verläßliches Maß für das spätere Schicksal des Versuchstiers; ermöglicht sie also eine Voraussage der Überlebenschance des Lebewesens mit Endotoxinschock?
2. Welche Art und welches Ausmaß an Leberzellschädigung läßt sich aus dem Enzymmuster ablesen?

Die erste Frage wird in der Literatur kontrovers beantwortet. SLEEMAN et al. (1968) zeigten bei Versuchen an Hunden eine LDH-Aktivitätszunahme, die nach ihren Angaben ein zuverlässiges Maß war, um - je nach Höhe der Zunahme - Überleben oder Tod der Versuchstiere vorauszusagen. Dagegen konnten HOLPER et al. (1973) keine Korrelation zwischen GOT- und LDH-Aktivität nach Endotoxingabe und dem nachfolgenden Schicksal der Tiere erkennen.

Vor allem auf die Frage, welche Aussagen über Art und Ausmaß der Zellschädigung durch Endotoxin gemacht werden können, sollten unsere Enzymbestimmungen Antworten geben.

Wie oben berichtet, fanden wir eine dosisabhängige, etwa 60 Minuten nach Endotoxingabe erkennbare Erhöhung der Transaminasen und der LDH, während die Aktivität der γGT und der Cholinesterase 90 Minuten nach Endotoxingabe im Vergleich zu den Versuchen ohne Endotoxingabe nicht erhöht war. In der Literatur wird von einer GOT-Aktivitätszunahme (MELBY et al. 1959) und einer LDH-Aktivitätszunahme (SLEEMAN et al. 1968) bei in vivo Versuchen mit septikämischen Hunden, von einer erhöhten Serumaktivität der GOT, LDH und Creatinphosphokinase (CPK) bei Kaninchen mit Endotoxinämie be-

richtet (KONTTINEN et al. 1964); sowie, bei Primaten im Endotoxinschock (HOLPER et al. 1973) von einer Zunahme der Transaminasenaktivität im Serum. Erhöhte Serumspiegel der Transaminasen, der sauren Phosphatase und der β-glucuronidase fanden SHANDS et al. (1972) bei Mäusen, die allerdings vor Endotoxingabe mit BCG sensibilisiert wurden.

An der isoliert perfundierten Rattenleber berichteten UTILI et al. (1976) von einer dosisabhängigen GOT- nicht aber - im Gegensatz zu unseren Ergebnissen - GPT-Zunahme. Auch UTILI et al. verwendeten Escherichia coli Endotoxin und ein künstliches Perfusionsmedium. Die Diskrepanz der Resultate kann aber durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen und -methoden bewirkt worden sein. So verwendeten UTILI et al. im Gegensatz zu uns ein rezirkulierendes System mit etwa gleicher Endotoxinkonzentration; darüberhinaus beobachteten sie das Verhalten der Leber nur 60 Minuten lang nach Zugabe von Endotoxin. Erkennbare Anstiege der GPT-Aktivität bei 2 mg % Endotoxinbelastung fanden wir aber erst nach etwa 60 Minuten Perfusion mit Endotoxin, signifikant wurden sie zum Zeitpunkt 90 (1 mg %), 60 (2 mg %) und 45 (3 mg %).

Schwierig gestaltet sich die Interpretation der Enzymmuster.

T r a n s a m i n a s e n u n d L D H

1. Von einigen Autoren werden freigesetzte Mediatorstoffe als Ursache der Enzymerhöhungen angesehen. So konnten HIGHMAN et al. (1959) an Hunden durch Gabe von Noradrenalin und Adrenalin einen Anstieg der GOT- und GPT-Aktivität im Serum der Versuchstiere erzeugen. Die im Endotoxinschock freigesetzten Mediatorstoffe werden deshalb für die veränderten Enzymmuster verantwortlich gemacht. Dieser Mechanismus kann bei unserer isolierten Methode nicht als Erklärung dienen.

2. Als für die Enzymanstiege ursächlich wird weiterhin die Gewebshypoxie im Schock genannt. In Experimenten mit Kaninchen konnte ASVALL (1960) durch künstlich erzeugte Hypoxie eine Enzymerhöhung im Serum provozieren. Auch ALPERS et al. nennen die Hypoxie und Ischämie der Leber als Ursache der Freisetzung von Zellenzymen in der Leber. Eine Hypoxie (verminderte arteriovenöse O_2-Differenz) und eine Ischämie (verminderter Leberdurchfluß) ergaben auch unsere Versuche an der isoliert perfundier-

ten Rattenleber. Möglicherweise verändern diese Vorgänge das Enzymmuster.

3. HIGHMAN (1959) vermutet, daß Endotoxin die Permeabilität der Zellorganell- und Zellmembranen in der Leber erhöht. Auch AGARWAL (1975) stellt fest, daß Lipopolysaccharide aus Bakterienwänden die Membranpermeabilitäten verändern. Die GPT soll vor allem bei erhöhter Zellpermeabilität freigesetzt werden (LIEHR et al. 1975).

Erhöhte LDH-Aktivität sowie eine stärkere Aktivitätszunahme der GOT gegenüber der GPT sind dagegen Indikationen für eine Zellnekrose (SCHMIDT et al. 1976). Eben das brachten unsere Versuche. Leberzellnekrosen konnten dagegen bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen von endotoxingeschädigtem Lebergewebe nicht erkannt werden (SCHUMER et al. 1970; LEVY et al. 1968). Allerdings fanden sie lysosomale und mitochondriale Strukturveränderungen, die zumindest die GOT-Erhöhung erklären könnten.

Wir vermuten, daß für die gefundenen Enzymmuster der GOT, GPT und LDH ein Zusammenspiel beider Mechanismen, Permeabilitätserhöhung und Zellorganellschädigung verantwortlich sind.

γ G T

Im Vergleich zu den Nullversuchen fanden wir bis 90 Minuten nach Endotoxingabe keine erhöhte Aktivität der γGT. Dieses Enzym gilt als sensibler Indikator für geringste hepatozelluläre Schädigungen (ISSELBACHER 1977) und wird bei Cholestase vermehrt synthetisiert (SCHMIDT et al. 1976). Es war deshalb überraschend, daß trotz der nachgewiesenen cholestatischen Wirkung des Endotoxins dieses Enzym als Indikator für die Vorgänge in der Leber in unseren Versuchen nicht geeignet ist.

C H E

Die Cholinesterase gilt als Indikator der Syntheseleistung der Leber (LIEHR et al. 1975). Die CHE ist ein Sekretionsenzym, das in der Leber gebildet wird und ins Blut sezerniert wird (RICHTERICH 1963). Offensichtlich wird diese Sekretions- und Syntheseleistung der Leber durch Endotoxin in keinem meßbaren Ausmaß eingeschränkt.

5.2 Akute Gabe von Endotoxin

Beim Vergleich beider Versuchsreihen - der Versuche mit konstanter Endotoxinkonzentration im Perfusionsmedium und jener Versuche mit akuter hochdosierter Endotoxinbelastung der Leber - fallen zwei Besonderheiten auf:

Die Leber reagiert weder mit einer akuten noch mit einer chronischen (bis Ende der Perfusion zunehmenden) Veränderung der gemessenen Werte.

1. Keine akute Wirkung
   Obwohl die Gesamtmenge an Endotoxin, das die Leber in etwa 3 min passiert, bei den Akutversuchen viel größer ist als bei der Perfusion mit 3 mg %, kommt es zu keiner sofortigen meßbaren Reaktion des Organs: Leber- und Gallefluß sowie die Aktivität der gemessenen Enzyme zeigen beim Zeitpunkt 5 min (also etwa 2 min nach akuter Belastung) und auch später keine Veränderung im Vergleich zu den Nullversuchen.
   Daraus, sowie aus der Tatsache, daß bei den Versuchen mit konstanter Endotoxinbelastung die gemessenen Wirkungen nicht sofort eintreten, läßt sich folgern, daß die Effekte von Escherichia coli Endotoxin an der Leber nicht nur durch die absolute Menge, sondern auch durch die Dauer der Einwirkung determiniert werden.

2. Keine chronische Wirkung
   Eine erst nach mehreren Minuten signifikante, bis zum Ende der Perfusionszeit hin zunehmende Abweichung der Werte von denen der Nullversuche ist bei den Versuchen mit konstanter Endotoxinkonzentration, nicht jedoch bei den Akutversuchen zu beobachten. Da BRAUDE et al. (1955) bei in vivo Experimenten eine Endotoxinclearance der Leber von 65 % in 15 Minuten (nach Injektion letaler Dosen) beobachteten, wird bei etwa dreiminütiger hoher Belastung sicher ein beträchtlicher Anteil Endotoxin vom RES phagozytiert. Gingen die gemessenen Veränderungen bei den Versuchen mit konstanter Belastung von phagozytierten, also i n den Zellen des RES der Leber befindlichen Lipopolysacchariden aus, müßte der Wirkungsablauf bei chronischer und bei akuter Belastung ähnlich verlaufen. Wir nehmen deshalb an, daß

diese Wirkungen nicht mehr von bereits geklärtem Endotoxin ausgehen. Unsere Annahme wird unterstützt durch Versuche, die zeigten, daß eine Schädigung oder Blockierung des RES bei Tieren die Endotoxinwirkungen verstärkt (stärkerer Enzymaktivitätsanstieg im Serum, größere Letalität: HOLPER et al. 1973). Während bei diesen in vivo Versuchen die Wirkung an anderen Organen pathogenetisch beteiligt ist und nicht klar von denen an der Leber abgegrenzt werden kann, bestärken unsere Ergebnisse die Vermutung, daß Phagozytose durch das RES der Leber die Toxizität des Endotoxins an der Leber vermindert. Das steht auch im Einklang mit der Hypothese BJØRNEBOEs et al. (1975), daß Endotoxin bei geschädigtem RES eine periportale Entzündung der Leber hervorruft; auch diese Wirkung von Endotoxin geht danach nicht von bereits phagozytiertem Endotoxin aus.

Zusammenfassend lassen sich aus den Ergebnissen der Akutversuche folgende Schlüsse ziehen:

1. Um ar der isoliert perfundierten Rattenleber meßbare Wirkungen zu entfalten, ist offenbar nicht nur eine bestimmte Absolutmenge an E.coli Endotoxin notwendig, sondern auch die Dauer, in der jene einwirkt, wichtig. Je größer die Menge u n d je länger die Zeit der Endotoxinbelastung, desto größer ist die Wirkung.
2. Die bei den Versuchen mit konzentrationskonstanter Belastung der Leber mit Endotoxin beobachteten Veränderungen an der Leber gehen vermutlich nicht vom phagozytierten Endotoxin aus.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber wurde untersucht, inwieweit E.coli Endotoxin die Funktion der Leber beeinflußt.

Betrachtet wurden Leberfluß, Gallefluß, die prähepatisch-posthepatische Sauerstoffdifferenz, sowie die Aktivitäten der Enzyme GOT, GPT, LDH, γGT und CHE im posthepatischen Perfusat.

Fünf Versuche wurden ohne Endotoxinbelastung durchgeführt. Damit wurden die Ergebnisse aus je 5 Versuchen mit kontinuierlicher Gabe von 1 mg %, 2 mg % und 3 mg % Endotoxin verglichen, sowie die Ergebnisse aus fünf Versuchen mit akuter Gabe von 20 mg Endotoxin.

Der Leberperfusatdurchfluß, der bei den Nullversuchen während 90 Minuten konstant blieb, zeigte bei kontinuierlicher Endotoxinbelastung mit 2 mg % und 3 mg % eine Abnahme, die desto früher signifikant wurde, je höher die Konzentration an Endotoxin war.

Der Gallefluß nahm schon bei den Nullversuchen im Verlauf der 90-minütigen Perfusion ab. Stärker war die Abnahme bei allen Endotoxingaben (1 mg %, 2 mg % und 3 mg %); sie wurde desto früher signifikant und war umso deutlicher, je höher die Endotoxinkonzentration war.

Die O_2-Differenz zeigte bei den Versuchen mit 3 mg % Endotoxinbelastung nach 75 Minuten einen signifikant niedrigeren Wert.

Die Aktivitäten der GOT, GPT und der LDH im posthepatisch entnommenen Perfusat stiegen im Verlaufe der Perfusion mit Endotoxin an. Die GOT- und GPT-Aktivität wurde bei Perfusion mit 1 mg %, 2 mg % und 3 mg % Endotoxinperfusion signifikant höher als in den Nullversuchen. Die LDH-Aktivität stieg bei 2 mg % und 3 mg % Endotoxingabe stärker an als in den Nullversuchen.

Dagegen blieben die Aktivitäten der γGT und der CHE im Verlaufe der Perfusion unverändert; kein Unterschied zu den Nullversuchen war zu verzeichnen.

Die akute Gabe von 20 mg Endotoxin, das in ca. 3 - 4 Minuten die Leber passierte, führte weder zu einem kurzfristigen, noch zu einem im Verlauf der Perfusion deutlich werdenden signifikanten Untersohied zu den Nullversuchen des Leber- und Galleflusses und der Aktivitäten der GOT, GPT, LDH, γGT und CHE.

LITERATURVERZEICHNIS

AGARWAL M.K. — An integrative analysis of endotoxic reactions; Naturwissenschaften 62, 167-171 (1975)

ALPERS D.H., ISSELBACHER K.J. — Derangements of hepatic metabolism; in: Harrison's principles of internal medicine; THORN G.W., ADAMS R.D., BRAUNWALD E., ISSELBACHER K.J., PETERSDORF R.G. (ed.) pp. 1576-1580 International Student Edition, 8. Auflage 1977

ARTHUR A.B., WILSON B.D.R. — Urinary infection presenting with jaundice Br. Med. J. 1967/1; 539-540

ASVALL J.E. — Transaminase activity after experimental hypoxia in rabbits; Scan. J. Chin. Lab. Invest. 12 239-246 (1960)

BASLER H. — Grundbegriffe der Wahrscheinlichkeitsrechnung und statistischen Methodenlehre; Physica-Verlag Würzburg (1976)

BJØRNEBOE M., PRYTZ H. — Kupffer cells and cirrhosis; Lancet 1975/1; 45-46

BLATTBERG B., LEVY M.N. — Early hepatic and extrahepatic pooling in response to endotoxin; Am.J.Physiol. 219, 460-463 (1970)

BOEHRINGER MANNHEIM GmbH — Test-Fibel Schriftenreihe Diagnostica (1976)

BOYER J.L. — Canalicular bile formation in the isolated perfused rat liver; Am.J.Physiol. 221, 1156-1163 (1971)

BOYER J.L., KLATSKIN G. — Canalicular bile flow and bile secretory pressure. Evidence for a non-bile salt dependent fraction in the isolated perfused rat liver; Gastroenterology 59, 853-859 (1970)

BOYER J.L., RENO D. — Properties of Na^+-K^+-activated ATPase in rat liver plasma membranes enriched with bile canaliculi; Bioch. Biophys. Acta 401, 59-72 (1975)

BRAUDE A.T., CAREY F.J., ZALESKY M. — Studies with radioactive endotoxin. II. Correlation of physiologic effects with distribution of radioactivity in rabbits injected with lethal doses of E.coli Endotoxin labeled with radioactive sodium chromate; J. Chin. Invest. 34; 858-866 (1955)

COHN
GREENSPAN
GOLDSTEIN
GUDWIN
SIEGEL
DEL GUERICO
Arteriovenous shunting in high cardiac output shock syndroms;
Surg. Gyn. Obstet. 127, 282-288 (1968)

ERLINGER S.
DHUMEAUX D.
BERTHELOT P.
DUMONT M.
Effect of inhibition of sodium transport on bile formation in the rabbit;
Am. J. Physiol. 219, 416-422 (1970)

HARKEN A.H.
LILLO R.S.
HUFNAGEL H.V.
Direct influence of endotoxin on cellular respiration;
Surg. Gyn. Obstet. 140, 858-860 (1975)

HEIFFER M.H.
MUNDY R.L.
GRIMM L.J.E.
Effect of bacterial lipopolysaccharides on plasma catecholamine levels;
Fed. Proc. 17, 68 (1958)

HELINSKI D.R.
COOPER C.
Studies on the action of bovine serum albumine on aged rat liver mitochondria;
J. Biol. Chem. 235, 3573-3579 (1960)

HEMS R.
ROSS B.D.
BERRY M.N.
KREBS H.A.
Gluconeogenesis in the perfused rat liver;
Biochem. J. 101, 284-296 (1966)

HIGHMAN B.
MALING H.M.
Thompson E.C.
Serum transaminase and alkaline phosphatase levels after large doses of norepinephrine and epinephrine in dogs;
Am. J. Physiol. 196, 436-440 (1959)

HINSHAW L.B.
JORDAN M.M.
VICK J.A.
Mechanisms of histamine release in endotoxin shock;
Am. J. Physiol. 200, 987-989 (1961)

HINSHAW L.B.
REINS D.A.
HILL R.J.
Response of isolated liver to endotoxin;
Can. J. Physiol. Pharmac. 44, 529-541 (1966)

HOLPER K.
TREJO R.A.
BRETTSCHNEIDER L.
DI LUZIO N.R.
Enhancement of endotoxin shock in the lead-sensitized subhuman primate;
Surg. Gyn. Obstet. 136, 593-601 (1973)

ISSELBACHER K.J.
LA MONT J.T.
Diagnostic procedures in liver desease;
in: Harrison's principles of internal medicine;
THORN G.W., ADAMS R.D., BRAUNWALD E., ISSELBACHER K.J., PETERSDORF R.G., (ed) pp. 1580-1584 International Student Edition, 8. Auflage 1977

KENNY J.F.
MEDEARIS D.N.
KLEIN S.W.
DRACHMAN R.H.
GIBSON L.E.
An outbrake of urinary tract infections and septicemia due to Escherichia coli in male infants;
J. Ped. 68, 530-541 (1966)

KOBOLD E.
KATZ W.
THAL A.P.
Vasoactive mechanisms in endotoxin shock;
Fed. Proc. 22, 430 (1963)

KONTTINEN A.
RAJASALMI M.
PALOHEIMO J.
Serum enzyme activities in endotoxin shock;
Am. J. Physiol. 207, 385-388 (1964)

LEVY E.
SLUSSER R.J.
RUEBNER B.H.
Hepatic changes produced by a single dose of endotoxin in the mouse. Electron microscopy;
Am. J. Physiol. 52, 477-502 (1968)

LIEHR H.
GRÜHN M.
BRUNSWIG D.
SAUTHER TH.
Endotoxinämie bei Leberzirrhose;
Z. Gastroenterologie 14,
14-23 (1976)

LIEHR H.
KASPER H.
Leberkrankheiten;
Aesopus Verlag Milano, München, Lugano (1975)

Mc KAY D.G.
MARGARETTEN W.
CSAVOSSY I.
An electrone microscope study of endotoxin shock in rhesus monkeys;
Surg. Gyn. Obstet. 125, 825-832 (1967)

Mc LEAN L.D.
MULLIGAN W.G.
Mc LEAN A.P.H.
DUFF J.H.
Patterns of septic shock in man - A detailed study of 56 patients;
Ann. Surg. 166, 542-562 (1967)

MELA L.M.
MILLER L.D.
DIACO J.F.
SUGERMAN H.J.
Effect of Escherichia coli endotoxin on mitochondrial energy-linked function;
Surgery 68, 541-549 (1970)

MELBY J.C.
EGDAHL R.H.
BOSSENMAIER I.C.
SPINK W.W.
Suppression by cortisol of increased serum-transaminase induced by endotoxin;
Lancet 1959/I, 441-444

MELLORS A.
TAPPEL A.L.
SAMAN P.L.
DESAI I.D.
Mitochondrial swelling and uncoupling of oxidative phosphorylation of lysosomes;
Biochim. Biophys. Acta 193, 299-309, (1967)

MILLER L.L.
Technique of isolated rat liver perfusion; in: Isolated liver perfusion and its applications;
BARTOSEK I., GUAITANI A., MILLER L.L. (ed), pp. 11-52, Raven Press New York (1973)

MILLER L.L.
BLY C.G.
WATSON M.L.
BALE W.F.
The dominant role of the liver in plasma protein synthesis;
J. Exp. Med. 94, 431-453 (1951)

MILLER D.F.
IRVINE R.W.
Jaundice in acute appenticitis;
Lancet 1969/1, 321-323

MILLER L.D.
OSKI F.A.
DIACO J.F.
SUGERMAN H.J.
GOTTLIEB A.J.
DAVIDSON D.
DELIVORA-PAPADOPOULOS M.
The affinity of hemoglobin for oxygen: Its control and in vivo significance;
Surgery 68, 187-195 (1970)

MOSES J.M.
MAC INTYRE W.J.
Effect of endotoxin on simultaneously determined cardiac output and hepatic blood flow in rabbits;
J. Lab. Clinic. Med. 61, 483-493 (1963)

MULLER W.
SMITH L.L.
Hepatic circulatory changes following endotoxin shock in the dog;
Am. J. Physiol. 204, 641-445 (1963)

NG S.H.
RAWSTRON J.R.
Urinary tract infections presenting with jaundice;
Arch. Dis. Child. 46, 173-176 (1971)

NOLAN J.P.
O'CONNELL C.J.
Vascular response in the isolated rat liver;
J. Exp. Med. 122 (4-6), 1063-1073 (1965)

PETERSDORF R.G.
Septic Shock; in:
Harrison's principles of internal Medicine;
THORN G.W., ADAMS R.D., BRAUNWALD E., ISSELBACHER K.J., PETERSDORF R.G. (ed), pp. 770-775, International Student Edition, 8. Auflage 1977

PFANZAGL J.
Allgemeine Methodenlehre der Statistik II;
Sammlung Göschen,
Walter de Gruyter Berlin New York (1974)

RICHTERICH R.
Enzymdiagnostik der Leberkrankheiten;
Schweiz. med. Wschr. 93, 1363-1367, (1963)

ROONEY J.C.
HILL D.J.
DANKS D.M.
Jaundice associated with bacterial infection in the newborn;
Am. J. Dis. Child. 122, 39-41 (1971)

SCHIMASSEK H.
Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels der isoliert perfundierten Rattenleber;
Biochem. Z. 336, 460-467 (1963)

SCHIMASSEK H. — Der Einfluß der Leber auf den extrazellulären Redox-Quotienten Lactat/Pyruvat; Biochem. Z. 336, 468-473 (1963)

SCHMID M. — Leber; in: Klinische Pathophysiologie; SIEGENTHALER W. (ed), pp. 793-824, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 3. Auflage 1976

SCHMIDT E.; SCHMIDT F.W. — Kleine Enzym-Fibel; Schriftenreihe Diagnostica Boehringer Mannheim, 2. Auflage 1976

SCHUMER W.; Das GUPTA T.K.; MOSS G.S.; NYHUS L.M. — Effect of endotoxemia on liver cell mitochondria in man; Ann. Surg. 171, 875-882 (1970)

SEELER R.A.; HAHN K. — Jaundice in urinary tract infections in infancy; Am. J. Dis. Child. 118, 553-558 (1969)

SHANDS J.W.; SENTERFITT V.C. — Endotoxin-induced hepatic damage in BCG-infected mice; Am. J. Pathol. 67, 23-40 (1972)

SLEEMAN H.; JENNINGS P.B.; EMERY C.E.; HAMIT H.F. — Evaluation of biochemical changes associated with experimental endotoxemia; II. Lactic dehydrogenase activity; Surgery 64, 622-628 (1968)

THER L. — Grundlagen der experimentellen Arzneimittelforschung; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1965)

UTILI R.; ABERNATHY C.O.; ZIMMERMAN H.J. — Cholestatic effects of Escherichia coli endotoxin on the isolated perfused rat liver; Gastroenterology 70, 248-253 (1976)

UTILI R.; ABERNATHY C.O.; ZIMMERMAN H.J. — Studies on the effects of E.coli endotoxin on canalicular bile formation in the isolated perfused rat liver; J. Lab. Clin. Med. 89 (3) 471-482 (1977)

VERAGUT U.; SIEGENTHALER W.; GRUBER U.F. — Schock; in: Klinische Pathophysiologie; SIEGENTHALER W. (ed), pp. 640-659, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 3. Auflage 1976

WEIL M.H.; SHUBIN H.; BIDDLE M. — Shock caused by gram-negative microorganisms; Ann. intern. Med. 60, 384-400 (1964)

WHEELER H.O.
ROSS E.D.
BRADLEY S.E.

Canalicular bile production in dogs;
Am. J. Physiol. 214, 866-874 (1968)

WILKINSON S.P.
ARROYO V.
GAZZARD B.G.
MOODIE H.
WILLIAMS R.

Relation of renal impairment and haemorrhogic diathesis to endotoxaemia in fulminant hepatic failure;
Lancet 1974I, 521-524

WRIGHT C.J.
DUFF J.H.
Mc LEAN A.P.H.
Mc LEAN L.D.

Regional capillary blood flow and oxygen uptake in severe sepsis;
Surg. Gyn. Obstet. 132, 637-644 (1971)

ZWEIFACH B.W.
NAGLER A.L.
THOMAS L.

The role of epinephrine in the reactions produced by the endotoxins of gram-negative bacteria;
II. The changes produced by endotoxin in the rat mesoappendix and the isolated perfused rabbit ear;
J. Exp. Med. 104, 881-896 (1956).

Herrn Prof. Dr.med Hockerts danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der Mittel für die Experimente.

Für die Problementwicklung, die Planung und Hilfe bei der Verwirklichung der Versuche, für viele Erklärungen und die gute Zusammenarbeit sei Herrn Dr.med Urban gedankt.

Diplommathematiker Martin Bahr half mir bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Schließlich sei den Medizinisch Technischen Assistentinnen, die unzählige Enzymbestimmungen vornahmen, herzlich gedankt.

L E B E N S L A U F

Am 9. November 1954 wurde ich, Ortwin Pröbstl, als viertes der fünf Kinder des Arbeiters Georg Pröbstl und seiner Ehefrau Edelgunde Pröbstl, geborene Nocke in Schongau geboren.

Nach Besuch der Volksschule ab 1961 in Schongau trat ich 1965 in das mathematisch naturwissenschaftliche Gymnasium Schongau über und legte dort 1974 das Abitur ab.

Im November 1974 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Würzburg. Im August 1976 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung, im August 1977 den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Von Oktober 1978 bis März 1979 studierte ich am St. George's Hospital und Guy's Hospital London. Anschließend setzte ich das Studium in Würzburg fort und legte im März 1980 den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Im Praktischen Jahr wurde ich in Innerer Medizin und Chirurgie am Missionsärztlichen Institut Würzburg, in Neurologie an der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg ausgebildet. Am 22. April 1981 bestand ich die Ärztliche Prüfung in Würzburg.

Ortwin Pröbstl

Druckerei A. Staudenraus Würzburg